

PCT/JP03/12280

25.09.03

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 2 年 1 2 月 2 6 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 2 - 3 7 7 5 6 9
Application Number:
[ST. 10/C] : [J P 2 0 0 2 - 3 7 7 5 6 9]

REC'D 13 NOV 2003

WIPO

PCT

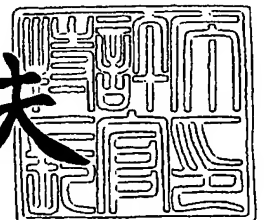
出 願 人 財団法人化学及血清療法研究所
Applicant(s):

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 3 年 1 0 月 3 0 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願
【整理番号】 JP422PR1YS
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 A61K 38/46
C12N 9/64
C07K 16/18

【発明者】

【住所又は居所】 熊本県菊池郡旭志村川辺四の西沖 1 3 1 4 - 1 財団法人化学及血清療法研究所 菊池研究所内

【氏名】 副島 見事

【発明者】

【住所又は居所】 熊本県菊池郡旭志村川辺四の西沖 1 3 1 4 - 1 財団法人化学及血清療法研究所 菊池研究所内

【氏名】 三村 のり子

【発明者】

【住所又は居所】 熊本県菊池郡旭志村川辺四の西沖 1 3 1 4 - 1 財団法人化学及血清療法研究所 菊池研究所内

【氏名】 前田 浩明

【発明者】

【住所又は居所】 熊本県菊池郡旭志村川辺四の西沖 1 3 1 4 - 1 財団法人化学及血清療法研究所 菊池研究所内

【氏名】 野崎 周英

【発明者】

【住所又は居所】 熊本県熊本市大窪一丁目 6 番 1 号 財団法人化学及血清療法研究所内

【氏名】 濱本 高義

【発明者】

【住所又は居所】 熊本県菊池郡旭志村川辺四の西沖 1 3 1 4 - 1 財団法人
化学及血清療法研究所 菊池研究所内

【氏名】 中垣 智弘

【特許出願人】

【識別番号】 000173555

【住所又は居所】 熊本県熊本市大窪一丁目 6 番 1 号

【氏名又は名称】 財団法人 化学及血清療法研究所

【代表者】 内野 矜自

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 特願2002-279924

【出願日】 平成14年 9月25日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 056568

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 微生物を寄託したことを証明する書面 1

【提出物件の特記事項】 追って補充する。

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 フォンビルプラント因子特異的切断酵素に対する抗体
及びそれを用いたアッセイ系

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 フォンビルプラント因子特異的切断酵素（以下、ADAMTS-13と称することがある）を構成するアミノ酸配列のうち全長または 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列または前記のいずれかのアミノ酸配列の部分配列もしくは前記アミノ酸配列を含有するポリペプチド鎖よりなる蛋白質に対する抗体。

【請求項 2】 ADAMTS-13が霊長類または齧歯類を起源とするものである請求項 1 記載の抗体。

【請求項 3】 配列番号表 1 記載のADAMTS-13を構成するアミノ酸配列のうち 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列または前記のいずれかのアミノ酸配列の部分配列もしくは前記アミノ酸配列を含有するポリペプチド鎖よりなる蛋白質に対する抗体。

【請求項 4】 配列番号表 1 記載のADAMTS-13を構成するアミノ酸配列よりなるポリペプチドに対し、当該ポリペプチドのSpacer領域より N 末端側またはCys-rich領域からSpacer領域の間を認識する抗体。

【請求項 5】 請求項 1 から 4 のいずれかに記載の抗体であって、ADAMTS-13を構成するアミノ酸配列のうち 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列または前記のいずれかのアミノ酸配列の部分配列もしくは前記アミノ酸配列を含有するポリペプチド鎖よりなる蛋白質のアフィニティ精製に用いられ得る抗体。

【請求項 6】 請求項 1 から 4 のいずれかに記載の抗体であって、ADAMTS-13を構成するアミノ酸配列のうち 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列または前記のいずれかのアミノ酸配列の部分配列もしくは前記アミノ酸配列を含有するポリペプチド鎖よりなる蛋白質が有する酵素活性を阻害もしくは中和し得る抗体。

【請求項 7】 請求項 1 から 6 記載のいずれか 1 項目に該当する抗体であつ

てポリクローナルな抗体。

【請求項 8】 請求項 1 から 6 記載のいずれか 1 項目に該当する抗体であってモノクローナルな抗体。

【請求項 9】 受託番号第 8174 (BP-8174)、受託番号第 8175 (BP-8175)、受託番号第 8176 (BP-8176) 及び受託番号第 8177 (BP-8177) として、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託されたいずれかのハイブリドーマが産生する抗体である請求項 8 記載のモノクローナルな抗体。

【請求項 10】 請求項 1 から 9 記載のいずれか 1 項目に該当する抗体によって認識される ADAMTS-13 のエピトープに結合することができる抗体。

【請求項 11】 請求項 1 から 9 記載のいずれかの抗体からなる医薬品組成物または診断薬。

【請求項 12】 請求項 1 から 9 記載のいずれか 1 項目に該当する抗体を構成成分とする標識蛋白質。

【請求項 13】 請求項 1 から 9 のいずれかに記載の抗体を産生し得る単離された細胞。

【請求項 14】 ハイブリドーマである請求項 13 に記載の細胞。

【請求項 15】 受託番号第 8174 (BP-8174)、受託番号第 8175 (BP-8175)、受託番号第 8176 (BP-8176) 及び受託番号第 8177 (BP-8177) として独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託された請求項 14 記載の細胞。

【請求項 16】 請求項 1 から 9 のいずれかに記載の抗体を含んでなる免疫測定キット。

【請求項 17】 ADAMTS-13 のアミノ酸配列の一部または全部を含むポリペプチドで温血動物を免疫感作する工程と、該免疫感作された温血動物の体液から請求項 1 から 9 のいずれかに記載の抗体を採取する工程を含む抗体の製造方法。

【請求項 18】 温血動物を免疫感作するためのポリペプチドが、ADAMTS-13 の一部として、配列表における配列番号 1 に示すアミノ酸配列の一部または全部を含む請求項 17 に記載の抗体の製造方法。

【請求項 19】 請求項 1 から 9 のいずれかに記載の抗体を産生し得る単離された細胞を生体内または生体外で培養する工程と、その体液または培養物から該抗体を採取する工程を含む抗体の製造方法。

【請求項 20】 抗体を産生し得る単離された細胞がハイブリドーマである請求項 19 に記載の抗体の製造方法。

【請求項 21】 塩析、透析、濾過、濃縮、遠心分離、分別沈澱、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲル電気泳動及び等電点電気泳動から選ばれる 1 種または 2 種以上を含む精製方法により抗体を採取する請求項 16 から 20 のいずれかに記載の抗体の製造方法。

【請求項 22】 請求項 1 から 9 のいずれかに記載の抗体を被験試料に接触させ、免疫反応により ADAMTS-13を検出することを特徴とする ADAMTS-13の検出方法。

【請求項 23】 請求項 1 から 9 のいずれかに記載の抗体を利用するラジオイムノアッセイ、エンザイムイムノアッセイまたは蛍光イムノアッセイである請求項 22 に記載の検出方法。

【請求項 24】 被験試料が生体から採取した生物学的試料である請求項 2 または 23 に記載の検出方法。

【請求項 25】 請求項 1 から 9 のいずれかに記載の抗体を ADAMTS-13と夾雑物質とを含む混合物に接触させて抗体に当該蛋白質を吸着させる工程と、吸着した当該蛋白質を抗体から脱着させる工程を含む ADAMTS-13の精製方法。

【請求項 26】 抗体が水不溶性担体に結合している請求項 25 に記載の精製方法。

【請求項 27】 ADAMTS-13の全長もしくは部分欠失変異体を主成分とする診断薬あるいは医薬品。

【請求項 28】 ADAMTS-13のSpacerから N 末端側、あるいは Cys-rich 領域から Spacer 領域を主成分とする請求項 27 記載の診断薬あるいは医薬品。

【請求項 29】 ADAMTS-13の全長もしくは部分欠失変異体を主成分としたエピトープ解析用抗原の利用及びその調製法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****【産業上の利用分野】**

本願発明は、医療用医薬品の分野に係る蛋白質に関する。詳細には、血液凝固に関与するフォンビルブランド因子(von Willebrand Factor：以下、vWFと称することがある)の特異的切断酵素（以下、ADAMTS-13と称することがある）の全長もしくは部分断片及びそれらに対する抗体に関する。本願発明で提供されるADAMTS-13に対する抗体により、血栓性血小板減少性紫斑病(thrombotic thrombocytopenic purpura：以下、TTPと称することがある)等を含む当該酵素の欠損・低下（一つの可能性として以下の報告がある；例えば、非特許文献1参照）の診断または本酵素蛋白質に対する自己抗体陽性患者の診断及びそれにとまなう疾病患者への当該酵素の補充療法のための効率的で高純度な当該酵素の調製の可能性が拓かれる。さらには、新規な抗ADAMTS-13薬としての利用も考えられる。

【0002】**【従来の技術並びに発明が解決しようとする課題】**

vWFは、血管内皮細胞や骨髄巨核球で産生され、2050アミノ酸残基(モノマー約250kDa)からなる単一サブユニットがS-S結合にて結ばれたマルチマー構造(分子量500～20,000kDa)を持って存在している止血因子である。血中濃度は約10 μ g/mlで、一般に高分子量のものほど比活性が高い。

vWFには2つの大きな止血因子としての機能があり、1つは血液凝固第VIII因子と結合し、これを安定化させるキャリアー蛋白質としての働き、もう1つは傷害血管壁の血管内皮細胞下組織に血小板を粘着・凝集させ、血小板血栓を形成する機能である。

【0003】

血栓性血小板減少性紫斑病は、全身の体組織細動脈と毛細血管に血小板血栓を生じる疾患であり、今日の医療技術の進歩にもかかわらず、当該疾患での関連死亡率は1971～1991年にかけて約3倍に増加している。病理学的に、TTPは血管内皮細胞障害や血管内血小板凝集によって惹き起こされると考えられて

おり、免疫組織学的には生じた血小板血栓中に多量の vWF の存在が認められ、vWF がこの成因に大きな役割を果たしていると考えられている。TTP 患者の vWF のマルチマー構造は正常もしくは高分子量が優位となっており、特に通常では見られない超高分子量の vWF (unusually large vWF multimer: UL vWFM) や高分子量 vWF 重合体 (large vWF multimer: L vWFM) が、高ずり応力下での血小板凝集の促進と微小血栓形成に大きな役割を果たしていることが推察される。一方で、vWF は健常人の循環血液中で高ずり応力下、vWF 切断酵素 (vWF-cleaving protease) の作用により 842 Tyr-843 Met の位置で分解を受けることが知られていた。したがって、TTP は血漿中の当該酵素活性が何らかの原因で低下して、UL vWFM ~ L vWFM が増加して血小板凝集が亢進し、血管内に血小板血栓が形成されるためというシナリオが描かれている。

【0004】

2001 年、この酵素活性を有する活性本体である vWF 切断酵素、別名 ADAMTS-13 をコードする遺伝子が本願出願人によりクローニングされた (例えば、特許文献 1 参照)。以下に、ADAMTS-13 の分子構造に関する知見を整理する。

ADAMTS-13 のドメイン構成は Signal peptide に続いて Propeptide が存在し、次いで、Furin の切断モチーフの RQRR 配列が存在し、HEXXHXXGXXHD のコンセンサス配列からなる Reprolysin タイプの亜鉛キレート領域を含む Metalloprotease domain が続く (P285stop まで)。そして、蛇毒メタロプロテアーゼで見出されるような Disintegrin-like domain を経て (W387stop まで)、一般的に分子認識に重要と考えられているおよそ 50 ~ 60 残基からなる最初の Tsp1 motif (Tsp1-1) (Q449stop まで) へとつながり、さらに、細胞接着モチーフの 1 つ RGDS 配列が含まれる Cys-rich region (T581stop まで) へと続く。次いで、システイン残基を全く含まない約 130 アミノ酸残基からなる Spacer domain (W688stop まで) を経て、再び Tsp1 motif の繰り返し (Tsp1-2 ~ 8) の後、補体成分 C1r あるいは C1s の中に最初に見つかったとされる CUB domain-1, 2 が続く。

【0005】

ところで、本酵素の効率的、高純度な精製法あるいは本酵素の存在量に関して

定性的、定量的な診断の方法は確立されていない。さらに本酵素に対する自己抗体陽性患者の診断法も確立されておらず、また、本酵素の活性発現の必須ドメインの特定もされていない。

斯かる状況に鑑み、本願発明の第一の課題は、高い選択性でADAMTS-13に対して免疫反応性を示す抗体を提供することにある。

本願発明の第二の課題は、斯かる抗体の製造方法を提供することにある。

本願発明の第三の課題は、斯かる抗体の用途を提供することにある。

本願発明の第四の課題は、上述の抗体あるいは自己抗体陽性患者由来の抗体の存在あるいは認識領域を特定することを可能にする全長もしくは部分欠失させたADAMTS-13分子を提供することにある。

本願発明の第五の課題は、斯かる全長もしくは改変分子の製造方法を提供することにある。

本願発明の第六の課題は、斯かる全長もしくは改変分子の用途を提供することにある。

【0006】

【発明が解決しようとする問題点】

vWF特異的切断酵素の先天性欠損患者及び後天性の当該酵素に対する抗体陽性患者の治療法として、現在までプラズマ交換療法が施されており、当該酵素の精製品または遺伝子組換え体等純品による補充療法の確立が望まれる。家族性TTP患者は、先天性にvWF特異的切断酵素が欠損しており、非家族性では後天的に当該酵素に対する自己抗体の産生が原因と報告されている。したがって、家族性TTP患者には、本酵素の補充療法が望ましく（現実には血漿投与が行われている）、非家族性では、血漿交換による自己抗体の除去と本酵素の補充が必要である。

したがって、本酵素の効率的な調製法あるいは診断等が必要となるが、しかし、vWF切断酵素は、本願出願人による先の出願に記載の方法（特願2002-123103）あるいはその他の方法（例えば、非特許文献1及び非特許文献2参照）により、血漿あるいは組換え体発現上清中より精製される方法では、十分な純度及び収量が期待できない。また、本酵素の存在量、特に抗原量としての酵

素量を測定する術は今まで存在しなかった。

【0007】

【特許文献1】

特願 2002-123103号

【非特許文献1】

Kokame, K. ら、"Proc. N.A.S. USA"、2002年、第99巻、p. 1
1902-11907

【非特許文献2】

Fujikawa, K. ら、"Blood"、2001年、第98巻、p. 1662-1
666

【0008】

【課題を解決するための手段、発明の構成】

上述の状況の下、本願発明者等は先の出願（特願 2002-123103）において vWF 切断酵素の単離同定を達成するべく、鋭意研究を重ねた結果、従来報告のなかった所望の vWF 切断酵素の精製単離に成功し、その成熟型蛋白質のアミノ酸配列及び当該アミノ酸配列をコードする遺伝子を同定するに至った。そして、先の出願（特願 2002-123103）記載の遺伝子組換え技術により調製された ADAMTS-13 あるいはヒト血漿より調製された ADAMTS-13 あるいは先の出願（特願 2002-123103）により得られた知見に基づき、活性発現に必須と考えられる領域を特定するために、C 末端側 CUB ドメインより逐次欠失した改変分子を作製し、その vWF 切断活性を測定した。これにより Spacer 領域と呼ばれる配列番号表 1 に掲げるアミノ酸番号で 688 位近傍より N 末端側から構成される分子においてもその定性的な酵素活性は維持されることが確認された。一方で 581 位近傍までから構成される分子では正常な分泌が阻害され、449 位近傍までから構成される分子では培養上清中への分泌は認められるもののその酵素活性は微弱あるいは活性が認められないことが確認され、これらの知見により本酵素分子の活性発現に必須な領域が示された。これらから本酵素活性を中和しうる抗体の作製に必要なエピトープ領域あるいは活性を有する本酵素分子の検出が可能な抗体の作製が可能となった。

【0009】

そして、得られるADAMTS-13のアミノ酸配列を基に調製されるペプチド等を抗原にして、通常の免疫方法（Current Protocols in Molecular Biology、Antibody Engineering: A PRACTICAL APPROACH Edited by J. McCafferty et al.あるいはANTIBODY ENGINEERING second edition Edited by Carl A. K. BORREBAECK）によってモノクローナル及びポリクローナル抗体等の作製を行なった。または、ファージディスプレイ技術を利用した抗体作製技術（Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual Edited by Brian K. Kay et al.、Antibody Engineering: A PRACTICAL APPROACH Edited by J. McCafferty et al.あるいはANTIBODY ENGINEERING second edition edited by Carl A. K. BORREBAECK）により当該蛋白質と結合する抗体の作出が可能である。あるいは、これらの技術に基づき、本酵素に対する自己抗体陽性であるTTP患者検体からの本酵素活性の中和抗体もしくは単なる結合抗体の単離も可能である。そして、これらの抗体を用いることで、本酵素量の変動を伴う疾病、例えばTTPなどの疾患の診断及び治療への応用が可能となる。あるいは調製された抗体を用いて例えばマウスのAdamts-13に対する抗体を作製し、マウスへ移入もしくは、この抗体の遺伝子を組み込んだ発現ベクターをマウスへ移入することにより、自己抗体陽性のモデルマウスが作出される。

【0010】

ADAMTS-13に結合できる抗体を、ここに開示する。これらの抗体は、当該分野において標準的な技術を用いて改変することができる。また、ここに最初に例示する抗体と類似する抗体を、ここに教示することと公知の方法とを組み合わせ製造することもできる。抗体を生成するこれらの方法は、哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ウマ、ヤギ、ヒツジまたはサル）を、ADAMTS-13またはそれらのフラグメントで免疫あるいはADAMTS-13を遺伝子組換え的に発現できる発現ベクターを皮下、皮内もしくは筋肉内にトランスフェクトすることを含む。抗体は、当該分野において公知の様々な技術を用いて、免疫した動物から得ることができ、好ましくは、興味のある抗原に対する抗体の結合を用いて、スクリーニングすることができる。抗体及び／または抗体生成細胞の動物からの単離は、

動物を屠殺する工程によって行なうことができる。

【0011】

ADAMTS-13で哺乳動物を免疫する代替または補足として、ADAMTS-13に対する特異抗体を、例えば、ラムダバクテリオファージもしくは表面に機能的なイムノグロブリン結合ドメインを示すバクテリオファージフィラメントを用いて、発現させたイムノグロブリンの可変ドメインの組換え生成ライブラリーから得ることができる。ライブラリーは、いかなるADAMTS-13（もしくはフラグメント）によっても免疫されていない生物から得られた配列から構築された天然のもの、または興味のある抗原に曝された生物から得られた配列を用いて構築されたものとすることができる。

【0012】

ここに用いられるモノクローナル抗体は、KohlerとMilstein, Nature, 256:495, 1975によって最初に記載された方法、または組換え方法（MageとLamoyi, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 79-97頁、Marcel Dekker社、New York, 1987を参照）によって作製することができる。

【0013】

ハイブリドーマ法において、免疫のために用いられるADAMTS-13と特異的に結合する抗体を生成する、もしくは生成することができるリンパ球を引き出すために、皮下、腹腔内、または筋肉経路で、マウスまたは他の適した宿主動物を抗原で免疫する。あるいは、リンパ球をインビトロで免疫することができる。次いで、リンパ球を、適した融合剤、例えばポリエチレングリコールなどを用いてミエローマ細胞と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成させる[Goding, Monoclonal antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986) 参照]。

【0014】

このように調製したハイブリドーマ細胞は、好ましくは、未融合の親ミエローマ細胞の増殖もしくは生存を阻害する一以上の物質を含む、適した培地中に播種し、培養することができる。例えば、親ミエローマ細胞が酵素ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HGPRTもしくはHPR T）を欠

く場合、ハイブリドーマ用培地は、典型的には、ヒポキサンチン、アミノプテリン、及びチミジンを含み（HAT培地）、これらの物質がHGPRT欠損細胞の増殖を阻害する。

【0015】

好ましいミエローマ細胞は、有効に融合し、選択された抗体生成細胞によって安定した高レベルでの抗体発現が支持され、HAT培地などの培地に感受性を有するものである。

【0016】

ハイブリドーマ細胞を培養する培地は、ADAMTS-13に対するモノクローナル抗体の生成でアッセイする。好ましくは、特異結合は、固相酵素免疫検定アッセイ（ELISA）によって測定される。本発明のモノクローナル抗体は、ADAMTS-13あるいはその部分断片に特異的に結合するものである。

【0017】

抗体が結合するエピトープは、後述するC末欠失改変ADAMTS-13分子を発現させることでマッピングすることができる。従って、本発明は、例示された抗体が結合するADAMTS-13エピトープと結合することができる抗体を含む。

【0018】

本発明の好ましい実施態様において、モノクローナル抗体は、マイクロモルを超える親和性、または、例えばスキャッチャード分析により測定された時（MunsonとPollard、Anal. Biochem. 107:220, 1980参照）に、より大きな親和性（すなわち 10^{-6} モルよりも大きな親和性）を有するであろう。

【0019】

所望する特異性と親和性の中和抗体を生成するハイブリドーマ細胞を同定した後に、クローンを限界希釈法によりサブクローニングし、標準的な方法で培養する。この目的のために適した培地は、Dulbecco's改変イーグル培地またはRPMI-1640培地を含む。さらに、ハイブリドーマ細胞を、動物における腹水腫瘍として、インビボで増殖させることができる。

【0020】

サブクローンによって分泌されたモノクローナル抗体は、従来のイムノグロブ

リン精製法、例えばプロテインAセファロース、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、またはアフィニティークロマトグラフィーなどによって、好適に、培地、腹水液、または血清から分離される。

【0021】

本発明のモノクローナル抗体をコードする核酸は、当該分野において公知の方法、例えば齧歯類抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合できるオリゴヌクレオチドプローブを用いて、容易に単離、配列決定される。本発明のハイブリドーマ細胞は、抗体またはそれらのフラグメントをコードする核酸の好ましい供給源である。単離後、核酸は、発現ベクターまたはクローニングベクターに結紮し、次いでこれを宿主細胞に形質転換し、組換え宿主培養細胞においてモノクローナル抗体が生成されるように、これを培養することができる。

【0022】

所望する結合特性を有する抗体を生成することができるハイブリドーマは、抗体（抗体フラグメントを含む）をコードする核酸を含み、それらを発現することができる宿主細胞として、本発明の範囲内である。また、本発明は、抗体が生成し、好ましくは分泌される条件下で、抗体を生成することができる細胞を培養することを含む、抗体の生成方法を提供する。

【0023】

本発明の抗体は、様々な方法で改変することができる。さらに言えば、「抗体」という用語は、必要とされる特異性を示す結合ドメインを有する全ての結合物質を網羅するものとして解釈されるべきである。従って、本発明は、抗原またはエピトープ、ここではADAMTS-13に結合することができる抗体に類似した形状を有する、合成分子と分子を含む、抗体フラグメント、誘導體、抗体の機能的均等物及び相同体を網羅するものである。

【0024】

抗原または他の結合対を結合することができる抗体フラグメントの実施例は、VL、VH、C1及びCH1ドメインからなるFabフラグメント；VHとCH1ドメインからなるFdフラグメント；抗体の単一アームのVLとVHドメインからなるFvフラグメント；VHドメインからなるdAbフラグメント；単離さ

れたCDR領域とF(a b') 2フラグメント、ヒンジ領域でジスルフィドブリッジによって連結された二つのF a bフラグメントを含む二価フラグメントである。また、単鎖F vフラグメントも含まれる。

【0025】

本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、遺伝変異またはその他の変異を受けることができる。さらに、当業者によって、モノクローナル抗体は、元の抗体の特異性を保持するその他の抗体、ヒト化抗体またはキメラ分子を作製するための組換えDNAテクノロジーの技術を受けることができると解されるであろう。そのような技術は、抗体の、イムノグロブリンの可変領域または相補性決定領域(CDR)をコードするDNAを、異なるイムノグロブリンの、定常領域または枠組み領域をつなげた定常領域に導入することを含むことができる。

【0026】

イムノアッセイ 上記抗体は、異なる様々なアッセイ形式で、本発明の診断面において用いることができる。抗体は、ADAMTS-13に特異的に結合できる結合剤として、または試験試料に曝した後に、被検体によって占められた結合剤の結合部位の画分を測定するための現像剤として用いることができる。

【0027】

いくつかの場合において、抗体の使用、特にアッセイにおける現像剤としての抗体の使用は、検出できて、好ましくは測定できるシグナルを、直接的もしくは間接的に産出することができる、標識もしくはレポーター分子で、それらを標識することを含む。レポーター分子の連結は、直接的もしくは間接的に、例えばペプチド結合を介した共有結合または非共有結合とすることができる。ペプチド結合を介した連結は、抗体とレポーター分子をコードする遺伝子融合体の組換え発現により得ることができる。Hunterら、Nature, 144:945, 1962; Davidら、Biochemistry 13:1014, 1974; Painら、J. Immunol. Meth. 40:219, 1981; 及びNygren、J. Histochem. and Cytochem. 30:407, 1982に記載された方法を含む、抗体を検出可能部分に別々に結合させるための当該分野において公知のあらゆる方法を、用いることができる。

【0028】

好ましい一態様は、スペクトル的に単離された吸光もしくは発光特性を有する、各蛍光色素、蛍光体もしくはレーザー染料との各抗体の共有結合による。適した蛍光色素は、フルオロレセイン、ローダミン、ルシフェリン、フィコエリスリン及びテキサスレッドを含む。適した発色性染料は、ジアミノベンジジンを含む。他の検出できる標識は、放射性同位元素標識、例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{125}I または $^{99\text{m}}\text{Tc}$ と、検出できる反応生成物をもたらす反応を触媒し、シグナルを増幅することができる酵素標識、例えばアルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼまたは西洋ワサビペルオキシダーゼを含む。

【0029】

他のレポーターは、視覚的に観察される、電氣的に検出される、もしくは別様に記録される、検出可能なシグナルを、直接的もしくは間接的にもたらしすることができる、着色された、磁性もしくは常磁性の、生物学的もしくは化学的に活性な試薬である、高分子コロイド粒子または例えばラテックスビーズなどの微粒子物質を含む。これらの分子は、例えば、着色するもしくは変色する、または電氣的特性を変化させる反応を、触媒する酵素であることができる。これらは、エネルギー状態間の電氣的遷移により、特徴的なスペクトル吸収もしくは発光を生じるような、分子反応性であることができる。これらは、バイオセンサーと結合して用いられた化学的な存在を含むことができる。

【0030】

あるいは、またはさらに、抗体は、試料中に存在する他の物質に優先して、ADAMTS-13と特異的に結合できることから、抗体を結合剤として用いることができる。好適には、結合剤は、アッセイ中にそれらを容易に操作できるように、固型支持物上に、例えば定義した部位で、固定化する。これは、例えば、固型支持物に抗体を化学的に結合させるためのビオチン/アビジンまたはビオチン/ストレプトアビジンを用いるなど、物理吸着または化学吸着などの当該分野に公知の技術を用いて行なうことができる。通常、試料中に存在するADAMTS-13が結合剤に結合できるように、適切な条件下で、結合試薬と試料を接触させる。次いで、結合剤の結合部位の画分占有率を、現像剤を用いて測定することができる。

【0031】

上記のように、現像剤は、当該分野における公知の技術を用いて検出することができるように、（例えば、放射能標識、蛍光標識または酵素標識で）標識する。従って、放射能標識は、シンチレーションカウンターまたは他の放射線計数装置を用いて検出することができ、蛍光標識は、レーザーもしくは共焦点顕微鏡を用いて検出することができ、酵素標識は、基質における酵素標識の作用、典型的には、色の変化を生じる作用によって検出することができる。結合剤の占有結合部位に対して、現像剤が被検体と競合する競合的方法において、または結合剤と結合した、もしくは占有結合部位に結合した被検体と標識化現像剤が結合する非競合的方法において、現像剤を用いることができる。両方の方法により、被検体によって占有された結合部位の画分が示され、これにより試料中の被検体濃度が、例えば被検体の既知濃度を含む試料を用いて得られた標準と比較して、示される。

【0032】

診断的アッセイは、患者からの生物学的試料を用いて行なわれる。これらの試料は、直接的に用いられることができ、またはいくつかの事例においては、アッセイを行なう前に処置、例えば干渉する可能性のある試料中の物質を除去することなどを必要とすることができる。適した生物学的試料の例は、血液、尿、汗、組織または血清である。

【0033】

一実施態様において、本発明は、TTP様の疾患またはvWF依存性の血栓症の恐れのある患者を診断する方法に関し、該方法は、以下の工程を含む：（a）患者から得られた生物学的試料を、ADAMTS-13と特異的に結合できる抗体を固定化した固型支持物と接触させること；

（b）固型支持物を、抗体の未占有結合部位、結合ADAMTS-13または抗体の占有結合部位に結合できる標識化現像剤と接触させること；及び、（c）試料中におけるADAMTS-13の濃度に相応する値を得るために、工程（b）において特異的に結合している現像剤の標識を検出すること。

【0034】

さらなる実施態様において、本発明は、患者における vWF 依存性の血栓にまつわる診断をするための方法を提供し、該方法は以下を含む：（a）患者の生物学的試料を、請求項記載のいずれか一つの抗ADAMTS-13抗体と接触させること；及び、（b）試料中におけるADAMTS-13の抗ADAMTS-13抗体に対する結合を測定すること。

そしてさらに、試料中のADAMTS-13濃度に相応する値を、既知標準から得られた値に相関させる工程を、さらに含む。

【0035】

本発明の抗体は、あらゆる公知の方法、例えば競合的結合アッセイ、直接的及び間接的サンドウィッチアッセイ、及び免疫沈降アッセイ[Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp147-158 (CRC Press社、1987) 参照]、において用いられることができる。

【0036】

サンドウィッチアッセイは、各々、検出されるADAMTS-13の異なる免疫性部位もしくはエピトープに、結合できる二種の抗体の使用を含む。サンドウィッチアッセイにおいて、試験試料の被検体を、固型支持物上に固定化されている一次抗体と結合させた後、該被検体に二次抗体を結合させて、不溶性の三部複合体を形成させる。二次抗体は、それ自体を検出できる部分で標識することができ、または検出できる部分で標識した抗イムノグロブリン抗体を用いて測定することができる（間接的サンドウィッチアッセイ）。例えば、サンドウィッチアッセイの一つの型は、検出できる部分が酵素であるELISAアッセイである。

【0037】

また、本発明の抗体は、インビボでのイメージングに有用であり、ここで、抗体は、放射性同位元素などの検出できる部分で標識され、宿主に、好ましくは血流中に投与され、宿主における標識化抗体の存在と局在がアッセイされる。この抗体は、核磁気共鳴、X線透視、または当該分野において公知のその他の検出手段によって、宿主において検出できるあらゆる部分で、標識することができる。

【0038】

また、本発明の抗体は、アフィニティー精製剤としても有用である。この方法

において、抗体は、適した支持物、例えばセルロファイン樹脂もしくは濾紙上に、当該分野に公知の方法を用いて固定化する。次いで、精製すべきADAMTS-13を含む試料と固定化した抗体を接触させた後、固定化抗体に結合するADAMTS-13以外の試料中の全物質を完全に除去するであろう適した溶剤で、支持物を洗浄する。最後に、支持物を、抗体からADAMTS-13を遊離させるであろう他の適した溶剤、例えばグリシン緩衝液、pH 3～5で洗浄する。

【0039】

本発明の抗体は、薬学的組成物中に配合することができる。

薬学的組成物は、以上の抗体に加えて、薬学的に受容できる賦形剤、担体、緩衝液、安定剤または当該分野において公知であるその他の物質を含むことができる。そのような物質は、無毒であり、活性成分の効能に干渉しないものである。担体またはその他の物質の厳密な性質は、投与経路、例えば口、静脈、皮膚もしくは皮下、鼻、筋内、腹腔内経路に依存する。

【0040】

経口投与のための薬学的組成物は、錠剤、カプセル、粉末または液体形状であることができる。錠剤は、ゼラチンまたはアジュバントなどの固型担体を含むことができる。液体の薬学的組成物は、通常、液体の担体、例えば水、石油、動物性油、植物性油、鉱物性油、または合成油であることができる。生理食塩水、ブドウ糖もしくは他のサッカリド溶液またはグリコール、例えばエチレングリコール、プロピレングリコール、またはポリエチレングリコールが含まれる。

【0041】

静脈、皮膚もしくは皮下注射または苦痛部位への注射の場合は、活性成分が、発熱性因子を含まず、好適なpH、等張性及び安定性を有する、腸管外で受容できる水溶液の形状とするであろう。当業者は、適切な溶液を、例えば等張性の媒体、例えば塩化ナトリウム液、リンゲル液、乳酸加リンゲル液などを用いて、調製することができる。防腐剤、安定剤、緩衝液、抗酸化剤、及び／またはその他の添加剤を必要に応じて含むことができる。

【0042】

本発明のADAMTS-13に対する抗体を生理食塩水、緩衝液等で希釈して製剤化し

、医薬組成物を得ることもできる。製剤のpHは体液のpHに近い弱酸性～中性域のpHが望ましく、その下限は5.0～6.4が望ましく、その上限はpH6.4～7.4が望ましい。また、凍結乾燥形態等の長期間保存可能な形態で提供することもでき、この場合使用時に水、生理食塩水、緩衝液等で所望の濃度になるように溶解して使用することができる。本発明の製剤は、通常医薬品に用いられる薬理的に許容される添加剤（例えば担体、賦形剤、希釈剤等）、安定化剤または製薬上必要な成分を含有していてもよい。安定化剤としては、グルコース等の単糖類、サッカロース、マルトース等の二糖類、マンニトール、ソルビトール等の糖アルコール、塩化ナトリウム等の中性塩、グリシン等のアミノ酸、ポリエチレングリコール、ポリオキシエチレンーポリオキシプロピレン共重合体（プルロニック）、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル（トウイーン）等の非イオン系界面活性剤、ヒトアルブミン等が例示され、1～10w/v%程度が添加されていることが好ましい。

本発明の医薬組成物は、静脈内注射、筋肉内注射、皮下注射等により有効量で投与することができ、1回または数回に分けて投与される。その投与量は、症状、年齢、体重などによって異なるが、1回あたり、0.001mg～100mgが好ましい。

【0043】

【発明の効果】

本願発明によりもたらされた知見により、この発明の抗体は、ADAMTS-13に対して特異的に免疫反応性を示す。したがってADAMTS-13酵素量の迅速な検出、本酵素変動に伴う疾病の診断及びADAMTS-13の効率的な精製あるいはADAMTS-13の酵素活性の中和が可能となる。このように、本願発明で提供される抗体は、ADAMTS-13の検出及び精製をはじめとする多種多様の用途を提供するものでもある。斯くも有用なこの発明の抗体はこの発明による抗体の製造方法により所望量を容易に得ることができる。

本願発明は、斯くも顕著な作用効果を発揮するものであり、斯界に貢献すること誠に多大な意義のある発明であると云える。また、本願発明に用いられたADAMTS-13部分欠失体の利用により得られた知見についても機能上重要な領域の決定等意

義深い発明である。

なお、本願発明で提供されるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに受託番号第8174 (BP-8174)、受託番号第8175 (BP-8175)、受託番号第8176 (BP-8176) 及び受託番号第8177 (BP-8177) として寄託されている。

【0044】

以下に、実施例に従って本願発明を詳説するが、本願発明はこれら実施例に何等限定されるものではない。

【0045】

【実施例】

実施例 1

(ポリクローナル抗体 (PoAb) の作製)

マウスまたはウサギに、常法により (Current Protocols in Molecular Biology: Chapter 11 immunology、Antibody Engineering: A PRACTICAL APPROACH Edited by J. McCafferty et al.あるいはANTIBODY ENGINEERING second edition Edited by Carl A. K. BORREBAECKなど)、ヒトプラズマより部分精製した抗原タンパク、あるいはその一部のアミノ酸配列を有する合成ペプチド (一つの例として、本酵素のアイソフォームの一つのC末端領域のペプチド配列 (配列番号2) Phe-Ser-Pro-Ala-Pro-Gln-Pro-Arg-Arg-Leu-Leu-Pro-Gly-Pro-Gln-Glu-Asn-Ser-Val-Gln-Ser-Ser) を場合によっては至適なキャリアー物質 (KLH等) に結合させたもの (KLHを付加しやすくするためにCysをN末端あるいはC末端などに付加したもの)、あるいは遺伝子組換えタンパク質またはそれをコードする遺伝子を導入した発現ベクターを投与動物の皮下・皮内または筋肉内にトランスフェクトし、モノクローナル抗体発現ハイブリドーマの確立及びポリクローナル抗体 (抗血清) の作出を行なった。

【0046】

実施例 2

(モノクローナル抗体 (MoAb) の作製)

B a l b/c マウスに、初免疫感作として後肢にフロイント完全アジュバント存在下で先の出願（特願 2002-123103）記載の遺伝子組換え由来 ADAM TS-13 あるいは配列番号 2 記載のペプチドを、K L H をキャリアーとして付加したものを調製し、 $1\mu\text{g}$ から $10\mu\text{g}$ 相当量を 1 回接種した後、1 週間後に常法に従いマウス後肢大腿部のリンパ節より細胞を採取した。それぞれマウス 2 匹から、得られた細胞をミエローマ細胞 P 3 X 6 3 A g 8 U . 1 (P 3 U 1) (A T C C 寄託番号 C R L - 1 5 9 7 : C u r r . T o p . M i c r o b i o l . I m m u n o l . , v o l . 8 1 , p . 1 (1 9 7 8)) と細胞数 1 対 1 ~ 2 の割合で混合し、遠心処理 ($1,500\text{rpm}$ 、5 分) して上清を除き、沈殿した細胞塊を充分ほぐした後、予め 37°C に加温しておいた 1ml のポリエチレングリコール溶液 (45% ポリエチレングリコール 4000、55% R P M I 培地) を攪拌しながら加えた。 37°C で 5 分間インキュベートした後、液の全量が 50ml となるようにゆっくりと R P M I 培地を加えた。遠心分離 ($1,300\text{rpm}$ 、7 分) 後、上清を除去して緩やかに細胞をほぐした。これにエスクロン CM-B 培地 (三光純薬社製) 50ml を加え、メスピペットを用いて緩やかに細胞を懸濁した。この細胞懸濁液を 4 ~ 5 枚の 96 ウェル細胞培養プレートの各ウェルに $100\mu\text{l}$ ずつ分注し、5% 炭酸ガスを含む 37°C の CO_2 インキュベーター内で培養した。翌日に、H A T 培地 (エスクロン CM-B 培地にヒポキサンチン $1 \times 10^{-4}\text{M}$ 、チミジン $1.5 \times 10^{-3}\text{M}$ 、アミノプテリン $4 \times 10^{-7}\text{M}$ になるよう添加したもの) を各ウェルに $100\mu\text{l}$ ずつ分注し、5% 炭酸ガスを含む 37°C の CO_2 インキュベーター内で培養した。ハイブリドーマのコロニーが十分生育したものから H T 培地 (上記 H A T 培地からアミノプテリンを除いたもの) に交換し、培養上清の一部を分取し、以下に述べるスクリーニング法にて目的のハイブリドーマを選別した。

【0047】

目的のハイブリドーマの選別は下記の E I A 法、ウエスタン・ブロッティング法を組み合わせ実施した。

(1) E I A 法

96 穴のマイクロテストプレートに前記のごとく作製した合成ペプチド抗原、

もしくは精製抗原(蛋白質濃度 $0.5\sim 2\mu\text{g/ml}$)を $50\mu\text{l}$ /穴に加え、 4°C で一晩インキュベートすることにより固相化した。さらに、 1% BSA(ウシ血清アルブミン)溶液 $300\mu\text{l}$ を加え、同様にインキュベートしてマスキングを行なった。このようにして作製した抗原固相化プレートに細胞融合法によって得られたハイブリドーマ及びクローニング後のハイブリドーマの培養上清を加えて、 4°C で 1.5 時間インキュベート後、PBSで 3 回洗浄し、ペルオキシダーゼ標識抗マウス免疫グロブリン抗体溶液(カッセル社製、 $5,000$ 倍希釈)を $100\mu\text{l}$ /穴加えた。 4°C で 1 時間インキュベート後、PBSにて 5 回洗浄し、その後TMB Z基質溶液を加え、常法により発色させその吸光度を波長 450nm にて測定した。こうして精製抗原と反応するハイブリドーマクローンを選択した。

【0048】

(2)ウエスタン・ブロッティング法

EIAで得られた陽性コロニーについてウエスタン・ブロッティング法によるスクリーニングを行なった。精製抗原を 8% のSDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動し、PVDF膜上に移行させ、膜を $0.4\sim 0.5\text{cm}$ 幅に切断した。各細片をハイブリドーマ培養上清液に浸し、 1 時間 37°C でインキュベートした。その後、細片をTBST(0.05% Tween 含)で 3 回洗浄した後、アルカリフォスファターゼ標識抗マウスIgG(TAGO社製)の $1:2000$ 希釈液中で 37°C 、 1 時間インキュベートした。TBSTで 3 回洗浄後、BCIP/NBTを用いる発色試薬(Bio-Rad社製)で発色させ、精製抗原の発色バンドを示すハイブリドーマを選択しクローニングした。クローニング後のハイブリドーマクローンについても同様の手法で選別した。上記の選別方法によって所望のモノクローン抗体を産生するハイブリドーマおよそ 30 クローン得られた。

【0049】

実施例3

(ADAMTS-13C末欠失変異体の作製)

図1に示すストラテジーにより、先の特許出願(特願2002-123103)記載の全長のvWF切断酵素遺伝子クローニングベクター(pCR2.1vWFCP)を利用して、全長及びC末端より逐次ドメインを欠失させた変異体(Full1427st

op、T1135stop、W1016stop、W897stop、W808stop、W746stop、W688stop、T581stop、Q449stop、W387stop、P285stop、：それぞれの数字は開始コドン A T G のコードするMetから終結コドンまでのアミノ酸の残基数を示し、FLAGエピトープ（DNA配列:gactacaaggacgatgacgataagtga（配列番号18）、アミノ酸配列:Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys（配列番号19））を付加した部位を示す。）遺伝子を調製し、pCAG発現ベクター（Niwa, H., et al. Gene vol.108, 193-199）に組み込み、Hela細胞を用いて、以下の手順でトランスフェクトした。

まず初めに、 $1-3 \times 10^5$ 個/35mm dishで細胞を撚き、その翌日に上記発現ベクターを $2 \mu\text{g}$ 当たり $10 \mu\text{l}$ のPolyamine Transfection ReagentであるTransIT（TAKARA社製）をとり、Opti-MEM等の無血清培地 $200 \mu\text{l}$ に添加して、試薬添付文書に従い、DNAとのコンプレックスを調製後、準備しておいた前記各種細胞へ滴下し、6時間インキュベーションし、その後、培地をASF104無血清培地（味の素社製）に変更後、72時間 37°C インキュベーション後、その上清を回収した。検出は抗FLAG-M2抗体（コダック社製）を用いたウエスタンブロット法により、抗マウスIg-アルカリフォスファターゼ酵素標識抗体系で染色して行なった（図2に発現の様子を確認した結果を示す。）。

【0050】

実施例 4

（ADAMTS-13C末欠失変異体のvWF切断活性確認）

vWFの調製

vWFは、先の出願（特願2002-123103）記載の方法により調製した。簡単に述べると、セファクリルS-500HR（アマシャムファルマシア）の 2.6×90 cmカラムにより、プラズマクリオ画分2gを20 mLのバッファー（0.01% Tween-80 / 50 mM Tris-HCl / 100mM NaCl pH 7.4）に溶解したものをゲル濾過することにより調製した。

【0051】

vWF切断反応

vWF切断活性のアッセイは、先の出願（特願2002-123103）記載の方法により行なった。簡単に説明すると、終濃度10mMの塩化バリウムを加えた

サンプルを37℃で5分間プレインキュベートし、プロテアーゼの活性化を行なった。50mLのファルコンチューブにバッファー(15~20mLの1.5M Urea / 5mM Tris-HCl pH8.0)を入れた。次にミリポア社製のメンブレンフィルター(0.025 μ m)を浮遊させ、50 μ LのvWF基質溶液を加えて混合した活性化サンプルを100 μ L添加した。37℃のインキュベーターに一晩静置して翌日フィルターから回収した。回収したサンプルを、以下のSDS-PAGEの項に示すvWFの切断パターンにより評価した。

【0052】

SDS-PAGE

SDS-5%ポリアクリルアミドゲルを自家調製し使用した。vWF切断活性のアッセイ項で述べたサンプル10 μ Lに、SDS泳動バッファー(還元剤2-メルカプトエタノール存在下または不在下)2 μ Lを加え3分間煮沸したものを泳動サンプルとした。30mAで1時間電気泳動したのち、ゲルはCBB染色を利用したGel Code Blue Stain Reagent(PIERCE社)にて染色した。

【0053】

その結果、図3に示す如く、Full-lengthの分子からW688stopまでの分子で明らかなvWF切断活性が認められた。また先の抗FLAG抗体による上清中への発現パターンを考慮した場合、T581stopでの発現が上清中に認められないことからこの近傍(Cys-rich領域からSpacer領域)での切断は分泌障害を起こす場合があることが確認され、結論として本酵素活性を維持するためには、この領域を含むことが重要であろうと推察された。

【0054】

実施例 5

(ウェスタンブロットを利用した抗体のエピトープの解析)

常法により、ウェスタンブロットを行ない、確立したポリクローナル抗体(PoAb1, PoAb2)及びお互いに認識部位が競合しないと考えられたモノクローナル抗体数種(先の出願、特願2002-123103の明細書記載のClone No. CPHS WH10に加えて、WH63-1、WHS40-3、Pep4-34-1)についての認識領域を特定するため、実施例4記載の部分欠失改変分子の一時発現培養上清を利用し、ウェスタン

プロットを行なった（図4～9）。これらにより決定された抗体の認識領域及び活性発現に重要と考えられた領域を図10にまとめる。PoAblの認識領域は図4からQ449stop以降W688stopまでの間あるいは全長部分に渡っていることが推察され、後述するように本ポリクローナル抗体はADAMTS-13の酵素活性を中和することと併せて鑑みると（図17）この領域が中和に重要であることが推察された。したがって、機能発現に重要でかつ本酵素活性の中和エピトープとなりうる領域としてQ449stop以降W688stopまでの間（Cys-rich領域からSpacer領域）が想定された。

【0055】

実施例6

（ELISAを利用した抗ADAMTS-13抗体のエピトープ領域の確認）

イムノモジュール96ウェルプレートに抗FLAG抗体10 μ g/mL 100 μ Lを固相化したのちFLAGをポリペプチド鎖に付加した ADAMTS-13 wild typeもしくは各種上記欠失変異体を固相化、もしくはFLAGの付加に無関係に直接プレートへ本酵素変異体を固相化し、公知の方法によりブロッキング操作を施したプレートに適当に希釈された検体100 μ Lを反応後、プレートをTwwenなどの界面活性剤を含有するバッファーにて洗浄後、抗ヒトIgHRPコンジュゲートと37℃一時間反応させ洗浄後、TMBZ等で発色させることにより、エピトープ領域の絞込みを行なった。さらに、Full-length wild typeのADAMTS-13を固相化したプレートに患者試料を反応させる前に、欠失変異体と37℃30分プレインキュベーションしたものをプレートと反応後、抗ヒトIgHRPコンジュゲートと反応させた後、TMBZ等で発色させることにより、さらに詳細な抗体の結合領域を特定した。

【0056】

実施例7

（確立された抗体を用いてのウェスタンプロットによるヒト血漿中のADAMTS-13の検出）

続いて、上記種々の方法により調製された抗体を用いて、常法により（Current Protocols in Molecular Biology: Chapter 10 analysis of proteins、Chapter 11 immunologyなど）、本酵素のウェスタンプロット法による検出を行なっ

た。本酵素のC末端領域のペプチド配列（配列番号2）Phe-Ser-Pro-Ala-Pro-Gln-Pro-Arg-Arg-Leu-Leu-Pro-Gly-Pro-Gln-Glu-Asn-Ser-Val-Gln-Ser-SerをKLHに結合したものを免疫原として得られたペプチド抗体により、還元条件下、健常人血漿、TTP患者血漿中から本酵素の検出を行なったところ、一部のTTP患者血漿では明瞭ではないが、概ね250kDa程度の本酵素由来のシグナルと想定されるバンドが確認された（図11）。

【0057】

実施例8

（確立された抗体を用いた酵素免疫測定法によるヒト血漿中のADAMTS-13の検出・測定1）

得られたポリクローナル抗体とモノクローナル抗体の組み合わせにより（認識エピトープは図10参照）構築される酵素免疫測定法(ELISA)を用いて（図12）、様々な検体での本酵素の定量を行なった。定量のためのスタンダードは遺伝子組換えADAMTS-13を後述する抗体によるアフィニティー精製により得られたものを用いた。その結果、健常人血漿中のADAMTS-13濃度は用いた抗体により変化することが明らかとなり、これは血漿中で本酵素が様々な分子形態で存在することを示唆するものであった（表1）。このことから理想的なELISA系として、ドメイン毎に認識する抗体群からなる図13に示されるような系が想定され、さらに、この系で病態と血漿中の存在分子形態との相関を見ることが重要になることが推察される。

【0058】

【表1】

	MoAb(WH10)・PoAb1	MoAb(WH10)・PoAb2
Plasma 1	0.39 μ g/ml	1.2 μ g/ml
Plasma 2	0.27 μ g/ml	1.1 μ g/ml
Plasma 3	0.25 μ g/ml	0.9 μ g/ml
TTPplasma	0 μ g/ml	0 μ g/ml

【0059】

実施例 9

(確立された抗体を用いた酵素免疫測定法によるヒト血漿中のADAMTS-13の検出・測定 2)

得られたモノクローナル抗体を組み合わせることで構築される酵素免疫測定法(図14)により、数検体のヒト血漿中の本酵素の定量を行なった。その結果を前述の実施例5に示す結果と比較すると、この組み合わせの系は最も低い定量値を示した(表2)。また、この組み合わせでは後述するヒトプール血漿のFIペー
ストから精製された本酵素を検出することは出来なかった。つまり抗体の組み合わせにより定量値が変動するという事実を考慮すると抗体の組み合わせを変えた
様々な系の構築(図13)が重要と考えられた。

【0060】

【表 2】

	MoAb(WH10)-PoAb1	MoAb(WH10)-PoAb2	MoAb(WH10)-MoAb(WH63-1)
Plasma 1	0.39 μ g/ml	1.2 μ g/ml	0.13 μ g/ml
Plasma 2	0.27 μ g/ml	1.1 μ g/ml	0.09 μ g/ml
Plasma 3	0.25 μ g/ml	0.9 μ g/ml	0.09 μ g/ml
TTPplasma	0 μ g/ml	0 μ g/ml	0 μ g/ml

【0061】

実施例 10

(遺伝子組換えADAMTS-13の発現)

先の出願(特願2002-123103)記載の方法により、ヒト胎児腎細胞株である293細胞を用いて組換えADAMTS-13の安定発現株を作出した。概略として、以下の手順でトランスフェクトした。まず初めに $1-3 \times 10^5$ 個/35mm dishで細胞を巻き、その翌日に上記発現ベクターを2 μ g当たり10 μ lのPolyamine Transfection ReagentであるTransIT (TAKARA社製) をとり、Opti-MEM等の無血清培地200 μ lに添加して、試薬添付文書に従い、DNAとのコンプレックスを調製後、準備しておいた前記各種細胞へ滴下し、6時間インキュベーションし、その後、培地交換し、さらにその3日後G418添加選択培地に交換した。これからさら

に 3 日毎に培地交換を行ない、選択されたコロニー群から限界希釈法及び先のMo Ab(WH10)-PoAb1のELISA系を利用して、発現クローン (Clone No. V W F CP-293-3 5) を確立した。

【 0 0 6 2 】

実施例 1 1

(抗体を用いての遺伝子組換え体の培養上清からの遺伝子組換えADAMTS-13の精製)

得られた抗体の一例としてWH10を用いた例を示す。この抗体を適当な固定化担体に結合させることでアフィニティーカラムを作製し、当該酵素の精製に供した。アフィニティーカラムの調製には、チッソ社製NHS活性化セルロファインを用いて、添付文書に従い抗体を固定化した。これにより調製した約 1 m l の膨潤担体を用いて、実施例 9 に示す当該酵素の 2 9 3 細胞を宿主とした遺伝子組換え体の発現培養上清をアプライしたのち、50mM Tris-HCl 0.1M NaCl p H 7.5 (以下TBS) でカラムを洗浄後、0.1Mグリシン p H 3バッファーで溶出した。溶出された画分を1M Tris-HCl p H 8.5にて中和し、TBSに対して透析した。得られた精製酵素のSDS-PAGEを図 1 5 に示す。また、得られた精製画分に v W F を切断する活性が存在することも確認された。そして、この組換え酵素により断片化された v W F の切断点は、その断片のN末端アミノ酸配列解析から842Tyr-843Metの位置であることが確認された。

【 0 0 6 3 】

続いて精製された組換え体由来のADAMTS-13の部分アミノ酸配列を決定した。常法により、SDS-PAGE後、PVDF膜へトランスファーし、風乾したのち、PEアプライドバイオシステムズ社のオートプロテインシークエンサー492にて解析を行った。その結果、部分N末端配列としてAla-Ala-Gly-Gly-Ile-を有することが明らかとなった。この配列は、遺伝子構造から推定された当該酵素の成熟体のN末端配列に一致した。

【 0 0 6 4 】

実施例 1 2

(抗体を用いてのヒトプール血漿由来FIペーストからのADAMTS-13の精製)

FIペーストの可溶化

FIペーストは12gずつに小分けし凍結保存した。使用する前日に4℃に出して融解させ、翌日、可溶化バッファー(0.05% アザイド、50 mM Tris-HCl pH7.4、100 mM NaCl)を10 mg/mLになるよう、120mL加え37℃で2時間攪拌した。10000 rpmで10分間遠心した後、上清を回収し、プレフィルター、5.0 μ mフィルター、0.8 μ mフィルターの順でろ過したものを可溶化サンプルとした。

【0065】

vWF切断酵素のゲルろ過クロマトグラフィー

可溶化したFIペーストを、セファクリルS-300HR (アマシャムファルマシア)の5×90cmカラムにかけ、1回目のゲルろ過を行なった。可溶化バッファーと同じ0.05% アザイド、50 mM Tris-HCl pH7.4、100 mM NaCl(以後溶出バッファー)を用い、流速は5 mL/min.、分取は推定分子量100k~300kDaに相当する画分をプールし、これに、終濃度33%飽和となるよう飽和硫酸を少量ずつ滴下した。これをさらに一晩4℃に静置した。翌日10000rpm、10分遠心し、目的の活性画分を沈殿として回収した。以上の可溶化・ゲルろ過・硫酸沈殿の操作を5バッチ行ない、-20℃で凍結保存した。

【0066】

1回目のゲルろ過によって得られた硫酸沈殿物2~3バッチ分を、溶出バッファー50mLに溶解し1回目と同様セファクリルS-300HRカラム(5×90cm)に通液し、2回目のゲルろ過を行なった。溶出バッファー、条件、操作等については1回目と同様である。この操作を2回実施した。

【0067】

2回目のゲルろ過によって得られた硫酸沈殿物2回分を、溶出バッファー50mLに溶解し、1、2回目と同様、セファクリルS-300HRカラム(5×90cm)にかけ、3回目のゲルろ過を実施した。溶出バッファー、条件、操作等については1、2回目と同様である。そして推定分子量100k~300kDaに相当する画分をプールした。このプールサンプルを前述のリコンビナントADAMTS-13精製と同様の手順にてClone No. WH10モノクローナル抗体固定化カラムを用いて精製を行なった。その結果、図16に示されるようにSDS-PAGEにて105k~160kDaのサイズを有するほぼ単

一のADAMTS-13が精製された。このN末端アミノ酸配列を解析したところリコンビナントと同様の結果が得られた。

【0068】

実施例 13

(抗体による本酵素活性の中和)

前述の家兎ポリクローナル抗体によるvWF切断酵素の中和活性を評価した。遺伝子組換えADAMTS-13の1~10 μ g/ml (ブラッドフォード法にて概算) に対して、正常家兎血清、C末端領域のペプチド配列 (配列番号2) Phe-Ser-Pro-Ala-Pro-Gln-Pro-Arg-Arg-Leu-Leu-Pro-Gly-Pro-Gln-Glu-Asn-Ser-Val-Gln-Ser-SerをKLHに結合したものを免疫原として得られた家兎抗血清、及び全長ADAMTS-13発現ベクターにより発現された蛋白質により免疫誘導された抗血清 (PoAb1) のそれぞれを体積比1対1あるいは10倍希釈した抗血清を1対1で予め37℃で1時間反応させた後、前述したvWF切断活性のアッセイに供し、その活性の阻害を評価した。

【0069】 その結果、図17に示すごとく本酵素の阻害活性を有するものが調製された (メタロプロテアーゼのインヒビターであるEDTAを阻害の陽性コントロールとした。)。また、中和活性を有するポリクローナル抗体 (PoAb1) のエピトープ解析の結果 (図4) から、ADAMTS-13のドメイン構造中のSpacer領域よりN末側に中和エピトープが存在することが推察された。このことは、単に中和抗体の作製が可能であるという知見のみならず、vWF切断酵素に対する自己抗体陽性の後天的TTP患者様のモデルを構築できる可能性も示唆している。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110>JURIDICAL FOUNDATION THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH INSTITUTE

<120>Antibody against von Willebrand Factor cleaving protease and the assay method using the antibody thereof

<130>JP422PR1YS

<160>19<210>1

<211>1427

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>1

Met	His	Gln	Arg	His	Pro	Arg	Ala	Arg	Cys	Pro	Pro	Leu	Cys	Val
1				5					10				15	
Ala	Gly	Ile	Leu	Ala	Cys	Gly	Phe	Leu	Leu	Gly	Cys	Trp	Gly	Pro
				20					25				30	
Ser	His	Phe	Gln	Gln	Ser	Cys	Leu	Gln	Ala	Leu	Glu	Pro	Gln	Ala
				35					40				45	
Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ser	Pro	Gly	Ala	Pro	Leu	Lys	Gly	Arg	Pro
				50					55				60	
Pro	Ser	Pro	Gly	Phe	Gln	Arg	Gln	Arg	Gln	Arg	Gln	Arg	Arg	Ala
				65					70				75	
Ala	Gly	Gly	Ile	Leu	His	Leu	Glu	Leu	Leu	Val	Ala	Val	Gly	Pro
				80					85				90	
Asp	Val	Phe	Gln	Ala	His	Gln	Glu	Asp	Thr	Glu	Arg	Tyr	Val	Leu
				95					100				105	
Thr	Asn	Leu	Asn	Ile	Gly	Ala	Glu	Leu	Leu	Arg	Asp	Pro	Ser	Leu
				110					115				120	
Gly	Ala	Gln	Phe	Arg	Val	His	Leu	Val	Lys	Met	Val	Ile	Leu	Thr
				125					130				135	
Glu	Pro	Glu	Gly	Ala	Pro	Asn	Ile	Thr	Ala	Asn	Leu	Thr	Ser	Ser

140	145	150
Leu Leu Ser Val Cys Gly Trp Ser Gln Thr Ile Asn Pro Glu Asp		
155	160	165
Asp Thr Asp Pro Gly His Ala Asp Leu Val Leu Tyr Ile Thr Arg		
170	175	180
Phe Asp Leu Glu Leu Pro Asp Gly Asn Arg Gln Val Arg Gly Val		
185	190	195
Thr Gln Leu Gly Gly Ala Cys Ser Pro Thr Trp Ser Cys Leu Ile		
200	205	210
Thr Glu Asp Thr Gly Phe Asp Leu Gly Val Thr Ile Ala His Glu		
215	220	225
Ile Gly His Ser Phe Gly Leu Glu His Asp Gly Ala Pro Gly Ser		
230	235	240
Gly Cys Gly Pro Ser Gly His Val Met Ala Ser Asp Gly Ala Ala		
245	250	255
Pro Arg Ala Gly Leu Ala Trp Ser Pro Cys Ser Arg Arg Gln Leu		
260	265	270
Leu Ser Leu Leu Ser Ala Gly Arg Ala Arg Cys Val Trp Asp Pro		
275	280	285
Pro Arg Pro Gln Pro Gly Ser Ala Gly His Pro Pro Asp Ala Gln		
290	295	300
Pro Gly Leu Tyr Tyr Ser Ala Asn Glu Gln Cys Arg Val Ala Phe		
305	310	315
Gly Pro Lys Ala Val Ala Cys Thr Phe Ala Arg Glu His Leu Asp		
320	325	330
Met Cys Gln Ala Leu Ser Cys His Thr Asp Pro Leu Asp Gln Ser		
335	340	345
Ser Cys Ser Arg Leu Leu Val Pro Leu Leu Asp Gly Thr Glu Cys		
350	355	360

Gly Val Glu Lys Trp Cys Ser Lys Gly Arg Cys Arg Ser Leu Val		
	365	375
Glu Leu Thr Pro Ile Ala Ala Val His Gly Arg Trp Ser Ser Trp		
	380	390
Gly Pro Arg Ser Pro Cys Ser Arg Ser Cys Gly Gly Gly Val Val		
	395	405
Thr Arg Arg Arg Gln Cys Asn Asn Pro Arg Pro Ala Phe Gly Gly		
	410	420
Arg Ala Cys Val Gly Ala Asp Leu Gln Ala Glu Met Cys Asn Thr		
	425	435
Gln Ala Cys Glu Lys Thr Gln Leu Glu Phe Met Ser Gln Gln Cys		
	440	450
Ala Arg Thr Asp Gly Gln Pro Leu Arg Ser Ser Pro Gly Gly Ala		
	455	465
Ser Phe Tyr His Trp Gly Ala Ala Val Pro His Ser Gln Gly Asp		
	470	480
Ala Leu Cys Arg His Met Cys Arg Ala Ile Gly Glu Ser Phe Ile		
	485	495
Met Lys Arg Gly Asp Ser Phe Leu Asp Gly Thr Arg Cys Met Pro		
	500	510
Ser Gly Pro Arg Glu Asp Gly Thr Leu Ser Leu Cys Val Ser Gly		
	515	525
Ser Cys Arg Thr Phe Gly Cys Asp Gly Arg Met Asp Ser Gln Gln		
	530	540
Val Trp Asp Arg Cys Gln Val Cys Gly Gly Asp Asn Ser Thr Cys		
	545	555
Ser Pro Arg Lys Gly Ser Phe Thr Ala Gly Arg Ala Arg Glu Tyr		
	560	570
Val Thr Phe Leu Thr Val Thr Pro Asn Leu Thr Ser Val Tyr Ile		

575	580	585
Ala Asn His Arg Pro Leu Phe Thr His Leu Ala Val Arg Ile Gly		
590	595	600
Gly Arg Tyr Val Val Ala Gly Lys Met Ser Ile Ser Pro Asn Thr		
605	610	615
Thr Tyr Pro Ser Leu Leu Glu Asp Gly Arg Val Glu Tyr Arg Val		
620	625	630
Ala Leu Thr Glu Asp Arg Leu Pro Arg Leu Glu Glu Ile Arg Ile		
635	640	645
Trp Gly Pro Leu Gln Glu Asp Ala Asp Ile Gln Val Tyr Arg Arg		
650	655	660
Tyr Gly Glu Glu Tyr Gly Asn Leu Thr Arg Pro Asp Ile Thr Phe		
665	670	675
Thr Tyr Phe Gln Pro Lys Pro Arg Gln Ala Trp Val Trp Ala Ala		
680	685	690
Val Arg Gly Pro Cys Ser Val Ser Cys Gly Ala Gly Leu Arg Trp		
695	700	705
Val Asn Tyr Ser Cys Leu Asp Gln Ala Arg Lys Glu Leu Val Glu		
710	715	720
Thr Val Gln Cys Gln Gly Ser Gln Gln Pro Pro Ala Trp Pro Glu		
725	730	735
Ala Cys Val Leu Glu Pro Cys Pro Pro Tyr Trp Ala Val Gly Asp		
740	745	750
Phe Gly Pro Cys Ser Ala Ser Cys Gly Gly Gly Leu Arg Glu Arg		
755	760	765
Pro Val Arg Cys Val Glu Ala Gln Gly Ser Leu Leu Lys Thr Leu		
770	775	780
Pro Pro Ala Arg Cys Arg Ala Gly Ala Gln Gln Pro Ala Val Ala		
785	790	795

Leu	Glu	Thr	Cys	Asn	Pro	Gln	Pro	Cys	Pro	Ala	Arg	Trp	Glu	Val
				800					805				810	
Ser	Glu	Pro	Ser	Ser	Cys	Thr	Ser	Ala	Gly	Gly	Ala	Gly	Leu	Ala
				815					820				825	
Leu	Glu	Asn	Glu	Thr	Cys	Val	Pro	Gly	Ala	Asp	Gly	Leu	Glu	Ala
				830					835				840	
Pro	Val	Thr	Glu	Gly	Pro	Gly	Ser	Val	Asp	Glu	Lys	Leu	Pro	Ala
				845					850				855	
Pro	Glu	Pro	Cys	Val	Gly	Met	Ser	Cys	Pro	Pro	Gly	Trp	Gly	His
				860					865				870	
Leu	Asp	Ala	Thr	Ser	Ala	Gly	Glu	Lys	Ala	Pro	Ser	Pro	Trp	Gly
				875					880				885	
Ser	Ile	Arg	Thr	Gly	Ala	Gln	Ala	Ala	His	Val	Trp	Thr	Pro	Ala
				890					895				900	
Ala	Gly	Ser	Cys	Ser	Val	Ser	Cys	Gly	Arg	Gly	Leu	Met	Glu	Leu
				905					910				915	
Arg	Phe	Leu	Cys	Met	Asp	Ser	Ala	Leu	Arg	Val	Pro	Val	Gln	Glu
				920					925				930	
Glu	Leu	Cys	Gly	Leu	Ala	Ser	Lys	Pro	Gly	Ser	Arg	Arg	Glu	Val
				935					940				945	
Cys	Gln	Ala	Val	Pro	Cys	Pro	Ala	Arg	Trp	Gln	Tyr	Lys	Leu	Ala
				950					955				960	
Ala	Cys	Ser	Val	Ser	Cys	Gly	Arg	Gly	Val	Val	Arg	Arg	Ile	Leu
				965					970				975	
Tyr	Cys	Ala	Arg	Ala	His	Gly	Glu	Asp	Asp	Gly	Glu	Glu	Ile	Leu
				980					985				990	
Leu	Asp	Thr	Gln	Cys	Gln	Gly	Leu	Pro	Arg	Pro	Glu	Pro	Gln	Glu
				995					1000				1005	
Ala	Cys	Ser	Leu	Glu	Pro	Cys	Pro	Pro	Arg	Trp	Lys	Val	Met	Ser

1010	1015	1020
Leu Gly Pro Cys Ser Ala Ser Cys Gly Leu Gly Thr Ala Arg Arg		
1025	1030	1035
Ser Val Ala Cys Val Gln Leu Asp Gln Gly Gln Asp Val Glu Val		
1040	1045	1050
Asp Glu Ala Ala Cys Ala Ala Leu Val Arg Pro Glu Ala Ser Val		
1055	1060	1065
Pro Cys Leu Ile Ala Asp Cys Thr Tyr Arg Trp His Val Gly Thr		
1070	1075	1080
Trp Met Glu Cys Ser Val Ser Cys Gly Asp Gly Ile Gln Arg Arg		
1085	1090	1095
Arg Asp Thr Cys Leu Gly Pro Gln Ala Gln Ala Pro Val Pro Ala		
1100	1105	1110
Asp Phe Cys Gln His Leu Pro Lys Pro Val Thr Val Arg Gly Cys		
1115	1120	1125
Trp Ala Gly Pro Cys Val Gly Gln Gly Thr Pro Ser Leu Val Pro		
1130	1135	1140
His Glu Glu Ala Ala Ala Pro Gly Arg Thr Thr Ala Thr Pro Ala		
1145	1150	1155
Gly Ala Ser Leu Glu Trp Ser Gln Ala Arg Gly Leu Leu Phe Ser		
1160	1165	1170
Pro Ala Pro Gln Pro Arg Arg Leu Leu Pro Gly Pro Gln Glu Asn		
1175	1180	1185
Ser Val Gln Ser Ser Ala Cys Gly Arg Gln His Leu Glu Pro Thr		
1190	1195	1200
Gly Thr Ile Asp Met Arg Gly Pro Gly Gln Ala Asp Cys Ala Val		
1205	1210	1215
Ala Ile Gly Arg Pro Leu Gly Glu Val Val Thr Leu Arg Val Leu		
1220	1225	1230

Glu Ser Ser Leu Asn Cys Ser Ala Gly Asp Met Leu Leu Leu Trp		
1235	1240	1245
Gly Arg Leu Thr Trp Arg Lys Met Cys Arg Lys Leu Leu Asp Met		
1250	1255	1260
Thr Phe Ser Ser Lys Thr Asn Thr Leu Val Val Arg Gln Arg Cys		
1265	1270	1275
Gly Arg Pro Gly Gly Gly Val Leu Leu Arg Tyr Gly Ser Gln Leu		
1280	1285	1290
Ala Pro Glu Thr Phe Tyr Arg Glu Cys Asp Met Gln Leu Phe Gly		
1295	1300	1305
Pro Trp Gly Glu Ile Val Ser Pro Ser Leu Ser Pro Ala Thr Ser		
1310	1315	1320
Asn Ala Gly Gly Cys Arg Leu Phe Ile Asn Val Ala Pro His Ala		
1325	1330	1335
Arg Ile Ala Ile His Ala Leu Ala Thr Asn Met Gly Ala Gly Thr		
1340	1345	1350
Glu Gly Ala Asn Ala Ser Tyr Ile Leu Ile Arg Asp Thr His Ser		
1355	1360	1365
Leu Arg Thr Thr Ala Phe His Gly Gln Gln Val Leu Tyr Trp Glu		
1370	1375	1380
Ser Glu Ser Ser Gln Ala Glu Met Glu Phe Ser Glu Gly Phe Leu		
1385	1390	1395
Lys Ala Gln Ala Ser Leu Arg Gly Gln Tyr Trp Thr Leu Gln Ser		
1400	1405	1410
Trp Val Pro Glu Met Gln Asp Pro Gln Ser Trp Lys Gly Lys Glu		
1415	1420	1425
Gly Thr		
1427		

<210>2

<211>22

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>2

Phe Ser Pro Ala Pro Gln Pro Arg Arg Leu Leu Pro Gly Pro Gln

1 5 10 15

Glu Asn Ser Val Gln Ser Ser

20

<210>3

<211>30

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<400>3

ctggagcacg acggcgcgcc cggcagcggc 30

<210>4

<211>30

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<400>4

atgtgcaaca ctcaggcctg cgagaagacc 30

<210>5

<211>30

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<400>5

ccaacctgac cagtgtctac attgccaacc

30

<210>6

<211>21

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<400>6

ctggagccct gccacctag g

21

<210>7

<211>62

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<400>7

tccgtcgact cttatcactt atcgtcacg tccttgtagt cgtcccacac gcagcgcgcc 60

cg 62

<210>8

<211>62

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<400>8

tccgtcgact cttatcactt atcgtcacg tccttgtagt cgcgccatg cactgctgct 60

at 62

<210>9

<211>62

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<400>9

gccgtcgact cttatcactt atcgatcatg tccttgtagt cttgcgacat gaactccagc 60
tg 62

<210>10

<211>62

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<400>10

gccgtcgact cttatcactt atcgatcatg tccttgtagt ccagggtggg ggtaactgtc 60
ag 62

<210>11

<211>62

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<400>11

tccgtcgact cttatcactt atcgatcatg tccttgtagt ccacccaggc ctgccgtggc 60
tt 62

<210>12

<211>62

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<400>12

tccgtcgact cttatcactt atcgatcatg tccttgtagt cgtagggagg gcagggttcg 60
ag 62

<210>13

<211>62

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<400>13

tccgtcgact cttatcactt atcgtcacg tcctttagt ccctggcagg gcagggctgg 60
gg 62

<210>14

<211>62

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<400>14

gccgtcgact cttatcactt atcgtcacg tcctttagt ccacgtgtgc agcttgagcc 60
cc 62

<210>15

<211>62

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<400>15

gccgtcgact cttatcactt atcgtcacg tcctttagt ccctaggtgg gcagggctcc 60
ag 62

<210>16

<211>62

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<400>16

gccgtcgact cttatcactt atcgtcacg tcctttagt caccctgtcc cacacagggc 60

cc

62

<210>17

<211>60

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<400>17

tccaagcttg tcgactctta tcacttatcg tcacgctcct tgtagtcggt tccttccttt 60

<210>18

<211>27

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400>18

gactacaagg acgatgacga taagtga 27

<210>19

<211>8

<212>RPT

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Description of Artificial Sequence:Synthetic

<400>19

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

1

5

【図面の簡単な説明】

【図 1】 抗体のエピトープを決定するための C 末欠変異体作製法を示す

図である。

【図 2】 調製された C 末欠失変異体の一時発現を抗 F L A G 抗体を用いて非還元下ウェスタンブロットにて確認した図である。

【図 3】 調製された C 末欠失変異体の一時発現の v W F 切断活性を還元下の SDS-PAGE にて確認した図である。

【図 4】 PoAb1 のエピトープを確認した結果を示す非還元下ウェスタンブロットの図である。

【図 5】 PoAb2 のエピトープを確認した結果を示す非還元下ウェスタンブロットの図である。

【図 6】 MoAb Pep4-34-1 のエピトープを確認した結果を示す非還元下ウェスタンブロットの図である。

【図 7】 MoAb WH10 のエピトープを確認した結果を示す非還元下ウェスタンブロットの図である。

【図 8】 MoAb WH63-1 のエピトープを確認した結果を示す非還元下ウェスタンブロットの図である。

【図 9】 MoAb WHS40-3 のエピトープを確認した結果を示す非還元下ウェスタンブロットの図である。

【図 1 0】 各種抗体の認識領域と活性発現に重要な領域をまとめた図である。

【図 1 1】 v W F 切断酵素の部分合成ペプチドを免疫して得られたウサギ抗血清を用いた健常人血漿及び TTP 患者血漿中の ADAMTS-13 の確認を還元下ウェスタンブロット法で行なった結果を示す図である。

【図 1 2】 ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体を組み合わせで構築した ELISA 系の模式図とアッセイの流れ図である。

【図 1 3】 ドメイン毎に調製された抗体により構築された ELISA 法の概念図である。

【図 1 4】 モノクローナル抗体とモノクローナル抗体を組み合わせで構築した ELISA 系の模式図とアッセイの流れ図である。

【図 1 5】 ヒト胎児腎細胞株 293 を宿主とした培養上清から抗体カラムに

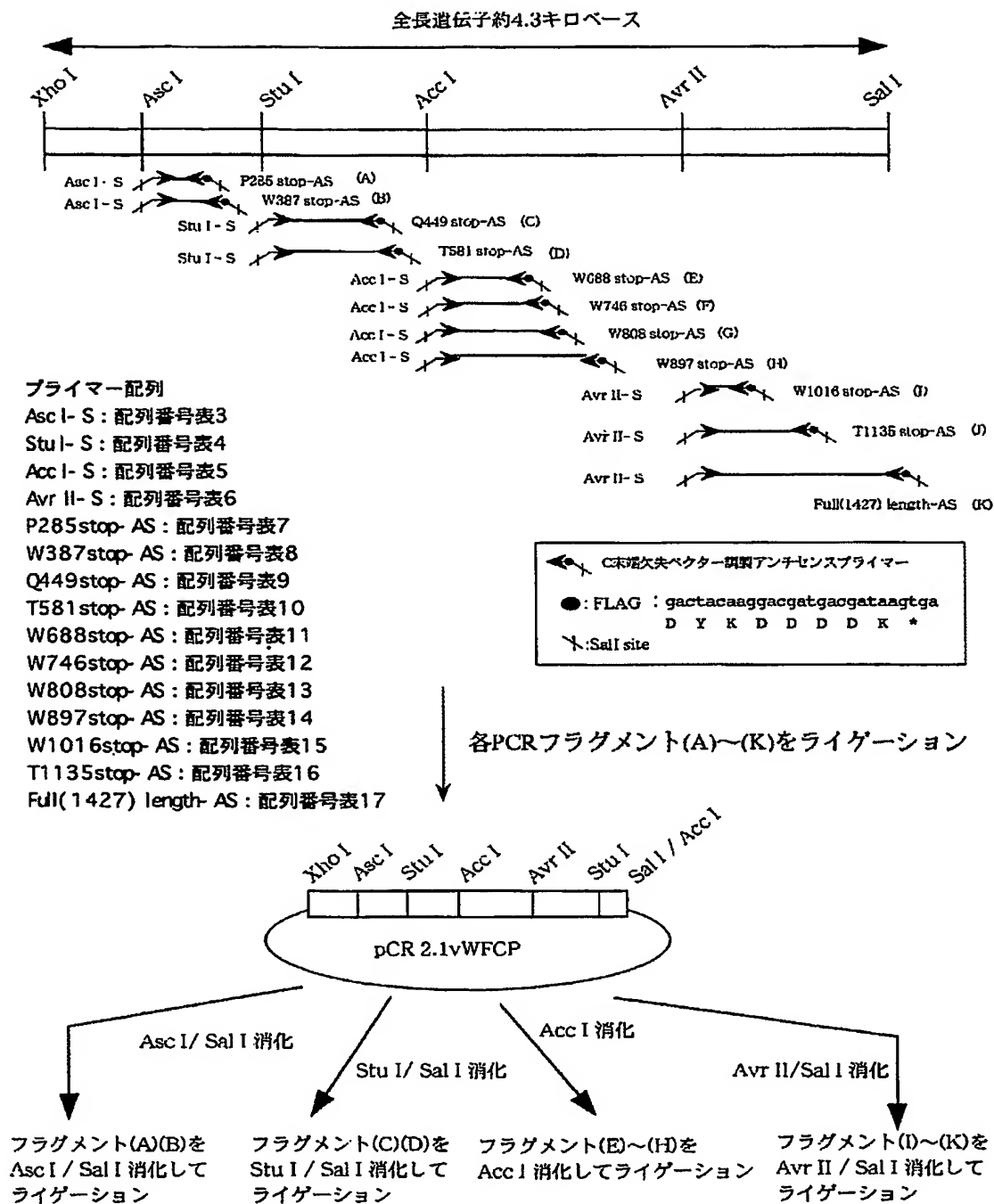
よりアフィニティー精製された遺伝子組換えADAMTS-13のSDS-PAGEの泳動図である。

【図 1 6】 ヒトプール血漿のFIペーストから抗体カラムによりアフィニティー精製されたADAMTS-13のSDS-PAGEの泳動図である。

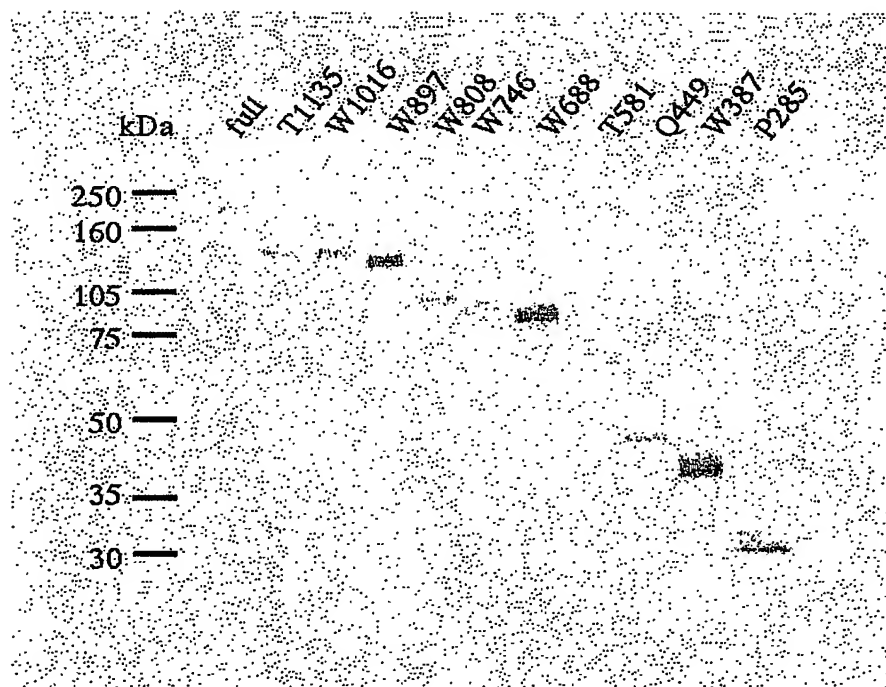
【図 1 7】 抗体を用いた中和活性能の評価（非還元下の v W F 切断活性の SDS-PAGE）。

【書類名】 図面

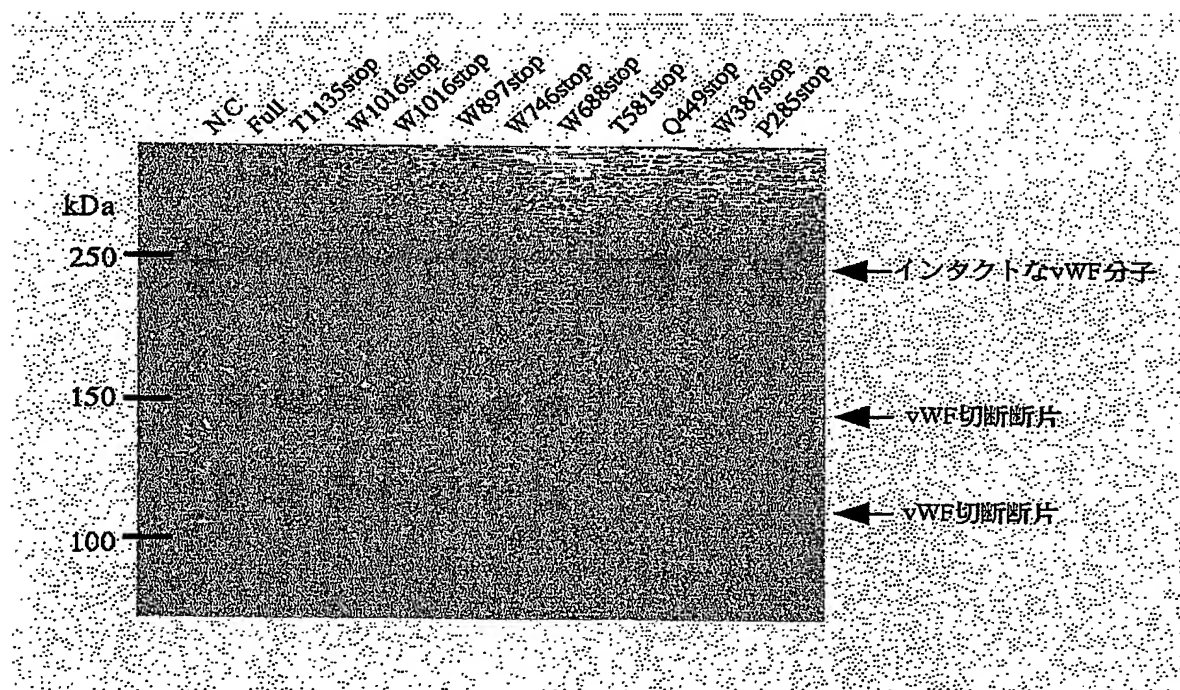
【図1】



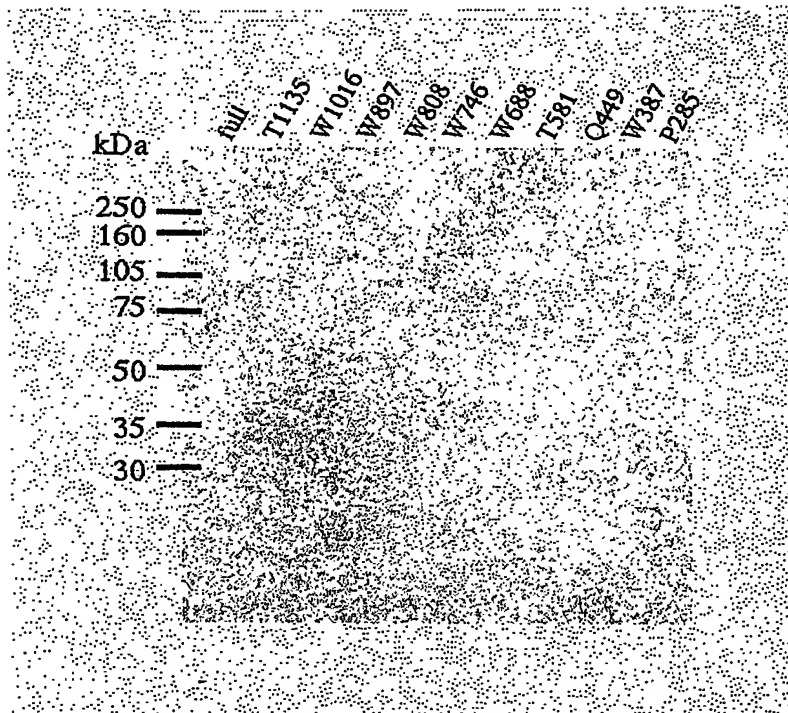
【図2】



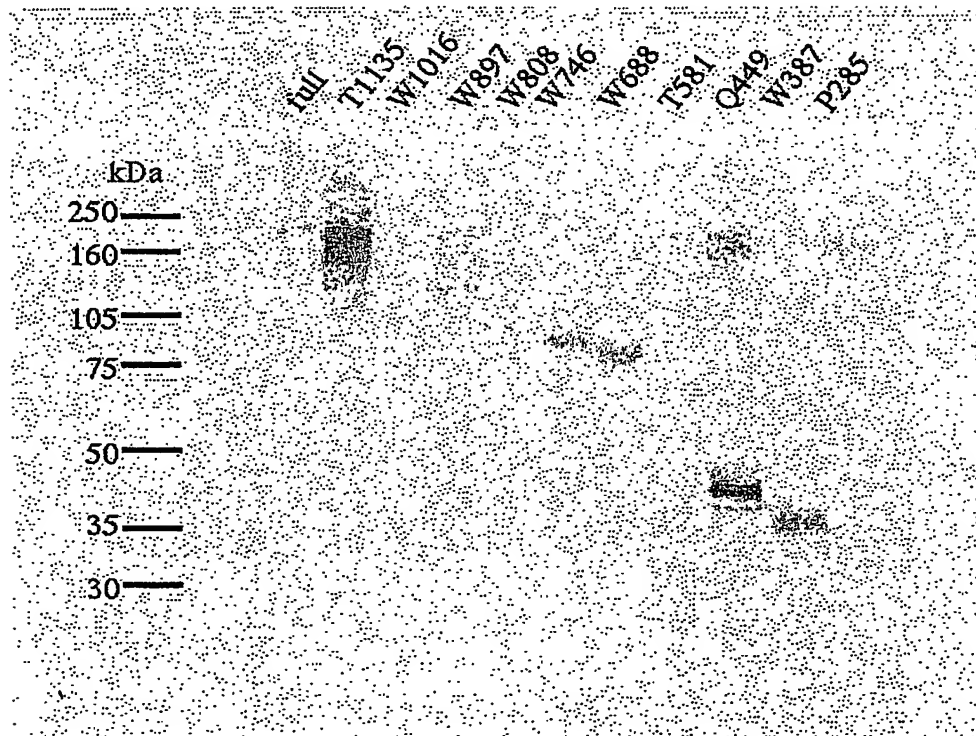
【図3】



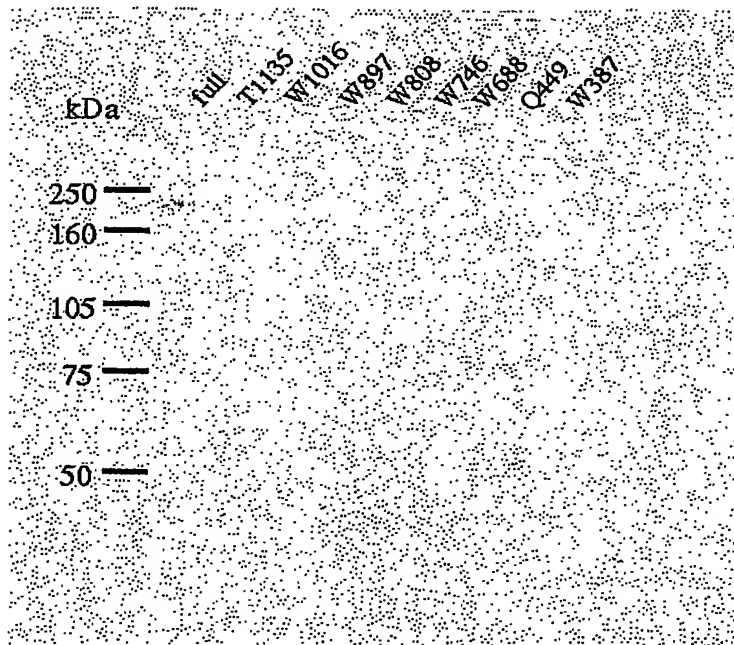
【図 4】



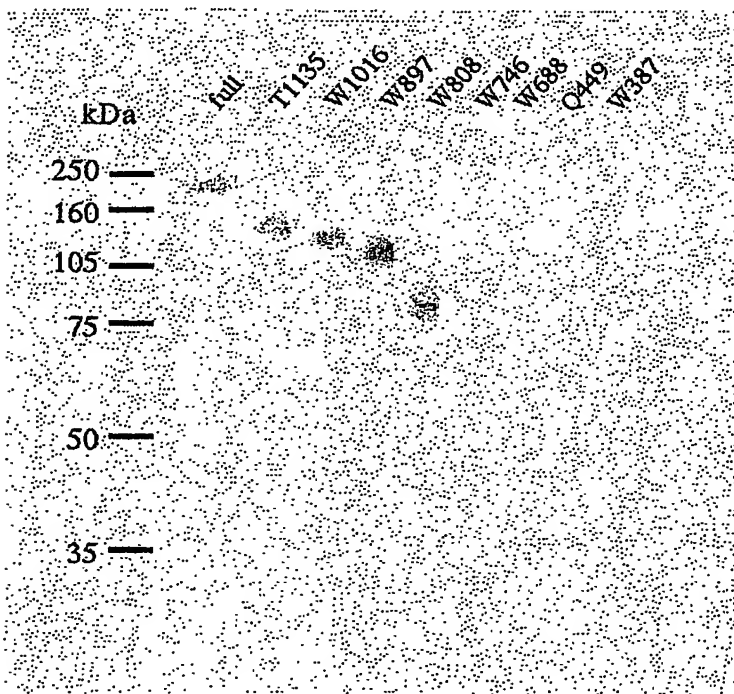
【図 5】



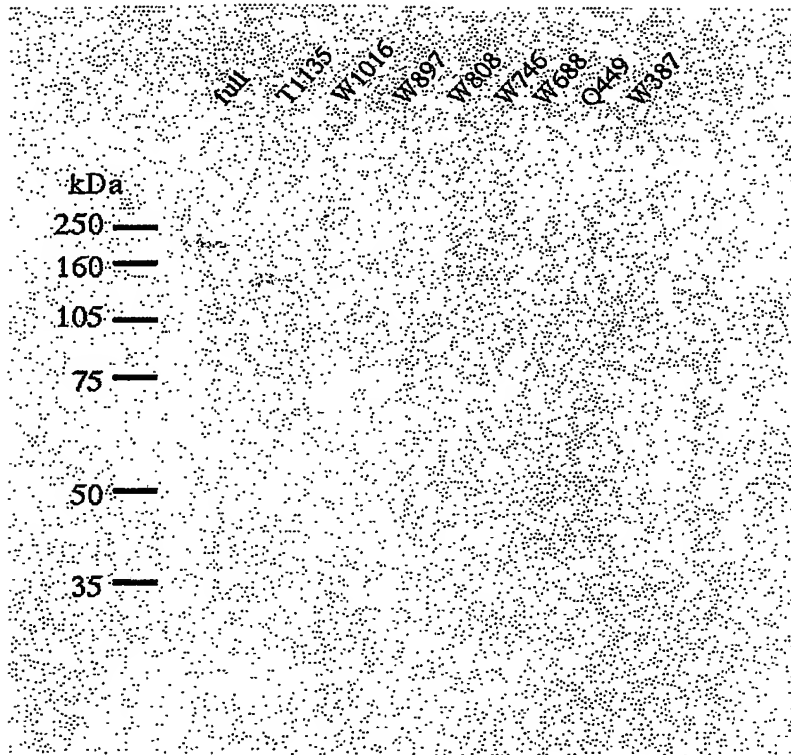
【図 6】



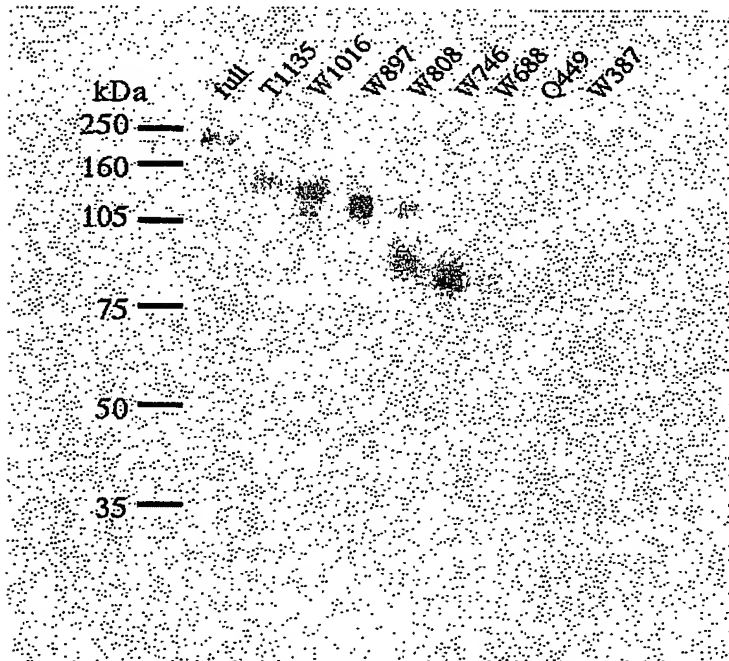
【図 7】



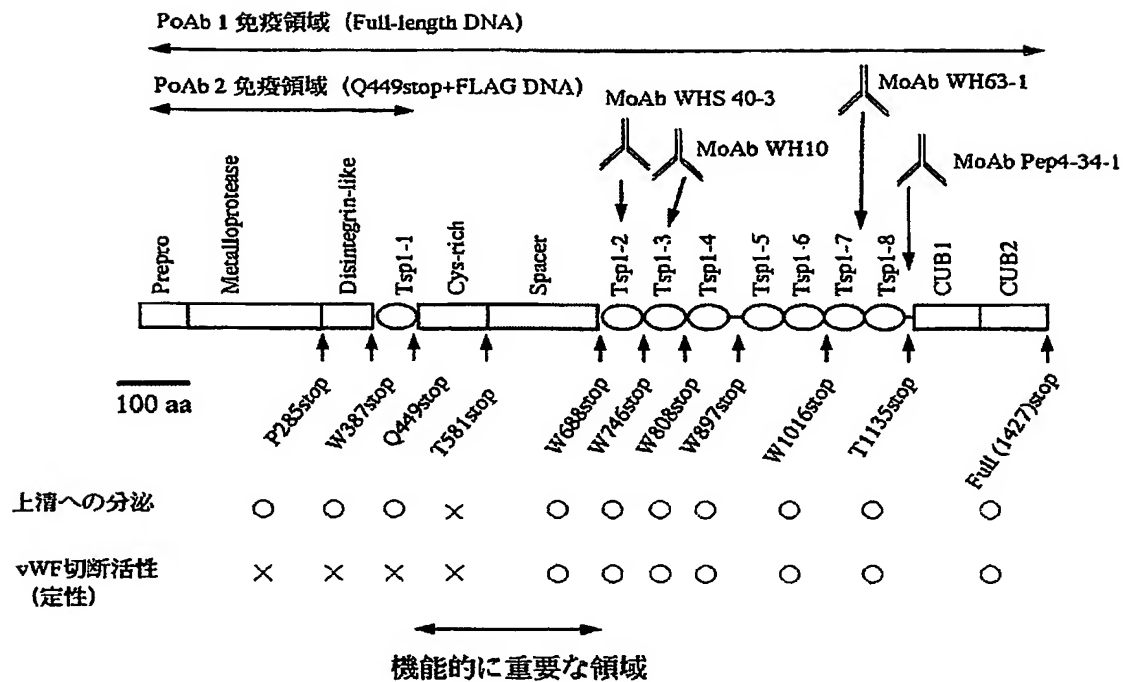
【図 8】



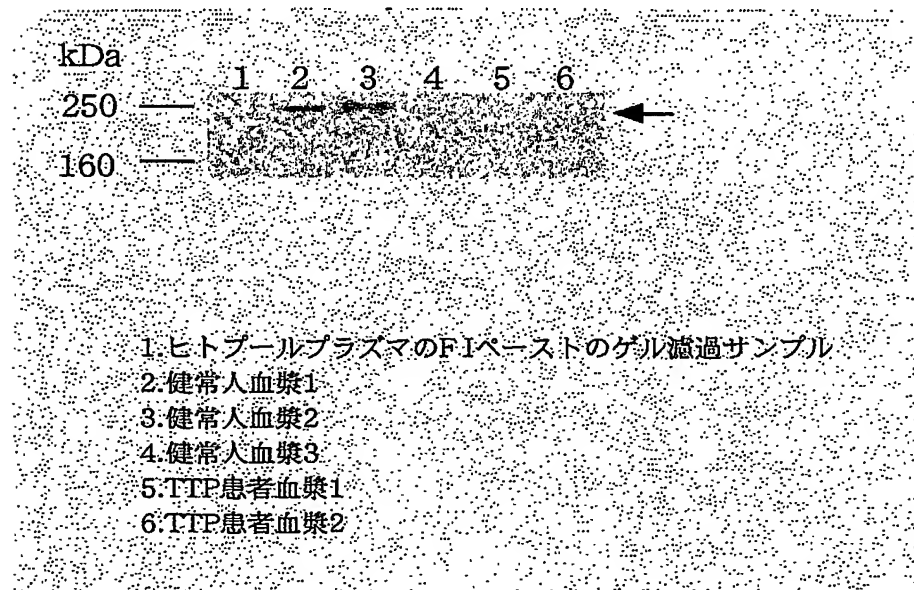
【図 9】



【図10】



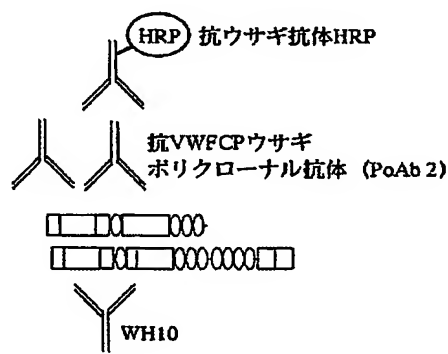
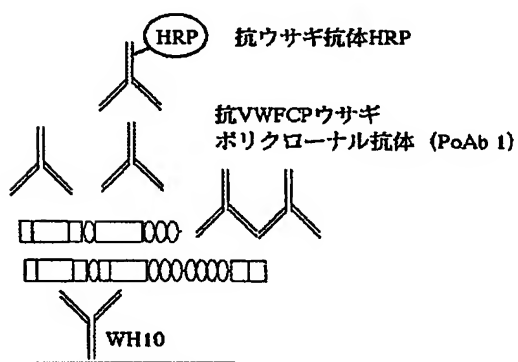
【図11】



【図 12】

【MoAb-PoAbの系】

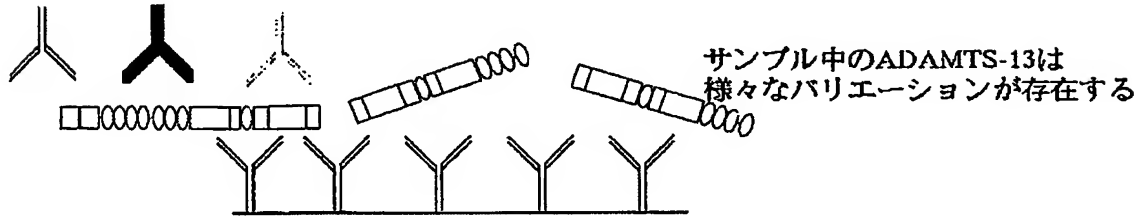
1. 各試薬類を室温に戻す。
2. WH10 MoAb固定化プレートにサンプルを100 μ l/ウェル添加
37 $^{\circ}$ C 1時間
3. 0.05% Tween-20 -TBSでプレート洗浄3回
4. PoAb 1 またはPoAb 2を1 μ g/mlとなるよう希釈液 (1%BSA-TBS) にて希釈し、100 μ l/ウェル添加
37 $^{\circ}$ C 1時間
5. 0.05% Tween-20 -TBSでプレート洗浄3回
6. 抗ウサギIgG HRP標識コンジュゲートを希釈液 (1%BSA-TBS) にて10000倍希釈し、100 μ l/ウェル添加
37 $^{\circ}$ C 1時間
7. 0.05% Tween-20 -TBSでプレート洗浄3回
8. TMB基質液 (直前に室温で2液を混ぜたもの) 100 μ l/ウェル添加 (ポジティブウェルは青色へ)
室温10分程度 (スタンダードとして同封の組み換え品100ng/mlの色が反応停止後、
最終的にOD450nm=1 程度となるように)
9. 反応停止液 (0.5 M 硫酸) を100 μ l/ウェル添加 (ポジティブウェルは黄色へ)
9. プレートリーダーにて450nm及び650nm測定



【図 13】

検出用の二次抗体

ドメイン毎に抗体を作製し、必要に応じて分子種を区別して定量する。

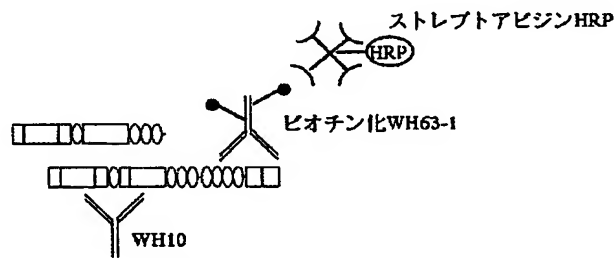
トラップ用の一次抗体

ポリクローナル抗体もしくは
N末より（メタロプロテアーゼドメインなど）の認識エピトープを
有するモノクローナル抗体を用いることで全てのバリエーション
のADAMTS-13をトラップする。

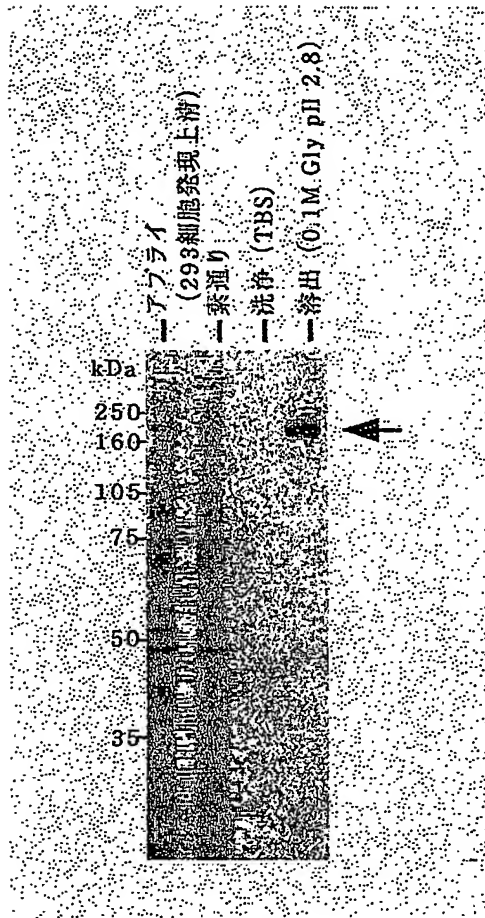
【図 14】

【MoAb-MoAbの系】

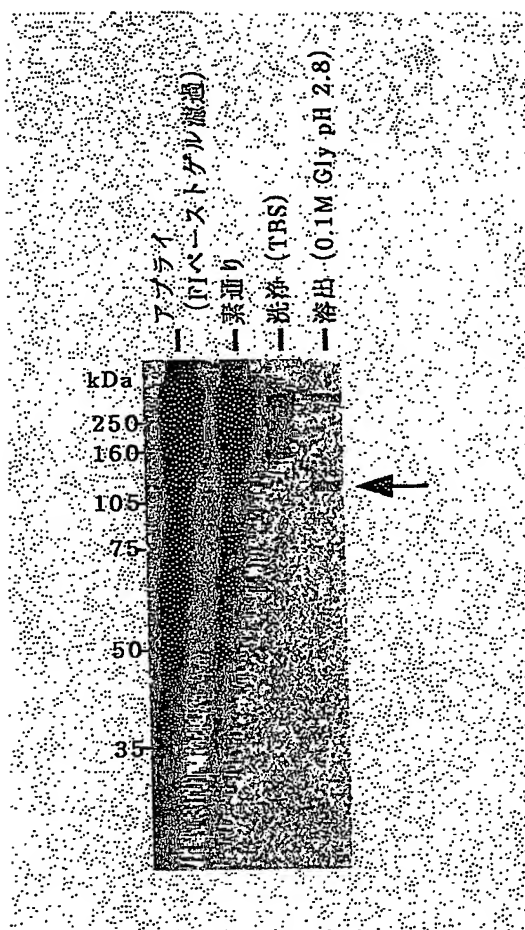
1. 各試薬類を室温に戻す。
2. WH10 MoAb固定化プレートにサンプルを100 μ l/ウェル添加
37°C 1時間
3. 0.05% Tween-20 -TBSでプレート洗浄3回
4. ビオチン化抗体を1 μ g/mlとなるよう希釈液 (1%BSA-TBS) にて希釈し、100 μ l/ウェル添加
37°C 1時間
5. 0.05% Tween-20 -TBSでプレート洗浄3回
6. ストレプトアビジン-HRP標識コンジュゲートを希釈液 (1%BSA-TBS) にて10000倍希釈し、100 μ l/ウェル添加
37°C 1時間
7. 0.05% Tween-20 -TBSでプレート洗浄3回
8. TMB基質液 (直前に室温で2液を混ぜたもの) 100 μ l/ウェル添加 (ポジティブウェルは青色へ)
室温10分程度 (スタンダードとして同封の組み換え品100ng/mlの色が反応停止後、
最終的にOD450nm=1 程度となるように)
9. 反応停止液 (0.5 M 硫酸) を100 μ l/ウェル添加 (ポジティブウェルは黄色へ)
9. プレートリーダーにて450nm及び650nm測定



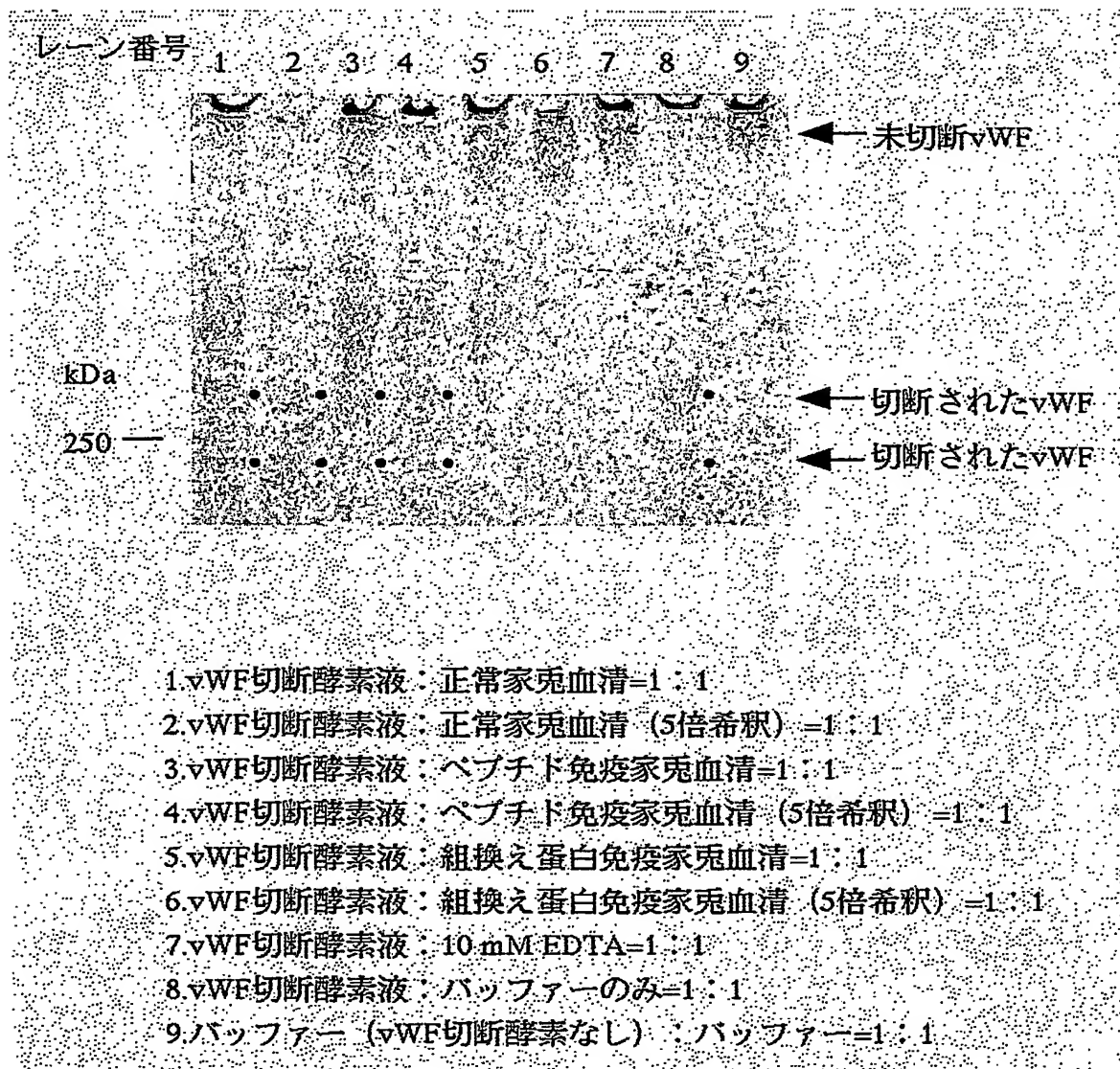
【図 15】



【図 16】



【図17】



【書類名】 要約書

【要約】

【目的】 ADAMTS-13に対して選択的に免疫反応性を示す抗体の提供並びに当該抗体のエピトープ解析またはADAMTS-13自己抗体陽性患者の診断への利用を目的とした。あるいは医薬品としての利用を目的とした部分欠失ADAMTS-13改変分子の製造方法及び用途を提供する。

【構成】 ADAMTS-13のアミノ酸配列の一部または全部を含むポリペプチドで免疫感作した温血動物から得ることができるADAMTS-13に特異的な抗体。ADAMTS-13のアミノ酸配列の一部または全部を含むポリペプチドで温血動物を免疫感作する工程を含む抗体の製造方法。ADAMTS-13の検出方法及び精製方法を含む当該抗体の用途並びに部分欠失ADAMTS-13改変分子を提供することよりなる。

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 2 - 3 7 7 5 6 9
受付番号	5 0 2 0 1 9 7 6 9 1 3
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0 0 9 4
作成日	平成 1 5 年 1 月 7 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】 平成14年12月26日

次頁無

特願2002-377569

出願人履歴情報

識別番号

[000173555]

1. 変更年月日

1996年 3月 4日

[変更理由]

住所変更

住 所

熊本県熊本市大窪一丁目6番1号

氏 名

財団法人化学及血清療法研究所